

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAYLISE DE CASSIA SANTOS PRZEPIURA

RESPOSTAS METABÓLICAS DO ENCÉFALO DE PEIXES
ANTÁRTICOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

CURITIBA

2016

THAYLISE DE CASSIA SANTOS PRZEPIURA

RESPOSTAS METABÓLICAS DO ENCÉFALO DE PEIXES
ANTÁRTICOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucélia Donatti

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Przepiura, Thaylise de Cassia Santos

Respostas metabólicas do encéfalo de peixes antárticos submetidos
ao estresse térmico. / Thaylise de Cassia Santos Przepiura. – Curitiba,
2016.

104f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Lucélia Donatti

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular.

1. Teleosteos. 2. Estresse oxidativo. 3. Peixe. I. Título II. Donatti,
Lucélia. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Profa. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Sílvia Romão
Universidade Federal da Fronteira Sul

Profa. Dra. Tatiana Herreiras
Universidade Positivo

Suplente:

Profa. Dra. Maritana Mela Prodócimo
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestrande **Thaylise de Cassia Santos Przeziura**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas metabólicas do cérebro de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico", são de parecer favorável à ~~aprovação~~ *aprovação* da acadêmica habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 31 de Março de 2016

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

Centro Politécnico

Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

Dedico este trabalho à minha avó Josefina (*in memoriam*), um anjo que Deus chamou no meio deste projeto. “Babka” você sempre estará viva em nossos corações.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lucélia Donatti, por acreditar em mim e aceitar o desafio de me orientar, pelo empenho e dedicação nas diversas análises deste trabalho. Obrigada também pelo seu apoio e amizade que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Marcia e Casemiro, que não medem esforços para que eu realize meus sonhos, ainda que isso custe deixar os seus um pouco de lado. Obrigada pelo apoio material, mas principalmente por todo amor e incentivo.

Aos meus irmãos, Laura e Matheus, que sempre me receberam com alegria nos finais de semana, recarregando minhas energias para seguir estudando.

Ao meu namorado Vicente que esteve ao meu lado me incentivando, cuidando e buscando depois de um dia intenso de trabalho. Obrigada pelo amor e paciência, foram essenciais em todas as etapas deste trabalho.

À minha família escolhida, meus amigos que longe ou perto são parte dos pilares que me mantiveram de pé, Mariane, Mayara, Willian, Lorena, Evelyn, Amanda, Carlota e Pedro.

Ao meu amigo e companheiro de apartamento Willian por me ajudar sempre que precisei, pelas pizzas e contas de luz divididas e pelo seu bom humor nem sempre bem explícito.

Aos meus tios, Ivete e Vicente, pelo apoio principalmente nos primeiros meses, por me receberem em sua casa com tanto carinho.

Às minhas amigas do laboratório de Biologia Adaptativa, Cintia, Tânia, Mariana, Maria Rosa, Priscila, Angela e Letícia, pela paciência em me ensinar, dando suporte nos experimentos, ajudando nos cálculos, tirando minhas dúvidas e pelos momentos de companheirismo dentro e fora do laboratório. Vocês são incríveis!

A todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado. Especialmente aos professores Francisco e Célia pelas contribuições no decorrer do trabalho e à professora Marcia pelos valiosos conhecimentos nas aulas de Docência.

À Marinha do Brasil, por todo apoio proporcionado durante as fases de coleta e realização dos bioensaios.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o mestrado.

Ao INCT-APA pelo apoio na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

Desde já agradeço a esta banca examinadora por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

*“Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço,
não do tamanho que as pessoas me enxergam.”*

— Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Os peixes antárticos da subordem Notothenioidei, passaram por períodos extraordinários de evolução e tem o seu metabolismo adaptado ao ambiente marinho antártico, muito frio e altamente oxigenado. Devido a essas características este grupo é considerado atraente para se estudar a plasticidade metabólica e os mecanismos celulares da resposta adaptativa a altas temperaturas. As variações de temperatura desencadeiam uma série de respostas metabólicas imprescindíveis para manter o metabolismo celular. O estudo do estresse térmico no tecido encefálico de peixes é interessante, pois este tecido controla, globalmente, o metabolismo do organismo. Alterações dos níveis da atividade das enzimas do sistema antioxidante, do metabolismo de carboidratos e de neurotransmissão são alguns exemplos de respostas ao estresse térmico. O presente trabalho investiga as respostas metabólicas do encéfalo de peixes antárticos, *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, frente ao estresse térmico. As coletas foram realizadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica. Os experimentos foram realizados na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e ambas as espécies foram expostas a temperaturas de $0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ (controle) e $8\pm0,5^{\circ}\text{C}$ (experimental) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. O aquecimento não afetou o nível de atividade da enzima acetilcolinesterase, relacionada com a neurotransmissão, em *N. rossii*, porém em *N. coriiceps* o nível de atividade foi positivo (6-12h). O metabolismo de carboidratos de *N. rossii* respondeu ao estresse térmico com alteração negativa no nível de atividade da hexoquinase (12h), lactato desidrogenase (2-6h) e glicose-6-fosfatase (144h). Já em *N. coriiceps* encontramos alterações positivas nos níveis de atividades da glicogênio fosforilase (2h) e glicose-6-fosfato desidrogenase (6h) e alterações negativas nas enzimas glicose-6-fosfatase (2,24-72h) e fosfofrutoquinase (72h). O estresse oxidativo em *N. coriiceps* frente ao aquecimento desencadeou alteração positiva no nível de atividade da catalase (12, 144h), glutational peroxidase (12h) e glutational-S-transferase (6,72h). Já em *N. rossii* alterações negativas foram encontradas no nível de atividade da glutational-S-transferase (2,12h), glutational redutase (2h) e glutational peroxidase (6-12horas) e modulações positivas na glutational peroxidase (72-144h). As enzimas citrato sintase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e as moléculas de tióis não proteicos e malondialdeído não alteraram seus níveis frente ao aquecimento em ambas as espécies. Observamos que *N. rossii* e *N. coriiceps*, espécies filogeneticamente próximas, possuem respostas metabólicas distintas frente ao estresse térmico.

Palavras-chaves: teleósteos antárticos, Nototheniidae, tecido encefálico, metabolismo de carboidratos, estresse oxidativo, neurotransmissão, altas temperaturas, Antártica.

ABSTRACT

The suborder of antarctic fish, Notothenioidei, went through extraordinary periods of evolution and have their metabolism adapted to the antarctic marine environment, which is very cold and highly oxygenated, making this group interesting for studies of adaptive mechanisms involving metabolic and cellular plasticity in response to high temperatures. Temperature variations are responsible for a variety of metabolic responses which are essential for maintaining cell metabolism. Studies of heat stress in the brain tissue of fishes are interesting because the brain controls, overall, the body's metabolism. Heat stress can alter the activity of antioxidant enzymes, in addition to promoting changes in carbohydrate metabolism and neurotransmission. The present study investigates the metabolic responses of the antarctic fish's brain, species *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*, against thermal stress. Samples were collected in Admiralty Bay, King George Island, in the South Shetlands Islands, Antarctic Peninsula. The experiments were performed in the Comandante Ferraz Antarctic Station (EACF) and both species were exposed to temperatures of 0 ± 0.5 °C (control) and 8 ± 0.5 °C (experimental) for 2, 6, 12, 24, 72 and 144 hours. The heat did not affect neurotransmission by activity level of acetylcholinesterase in *N. rossii*, but in *N. coriiceps* was changed positively (6-12h). The carbohydrate metabolism of *N. rossii* responds to thermal stress with negative alteration in the activity of hexokinase (12h), lactate dehydrogenase (2-6h) and glucose-6-phosphatase (144h). Additionally, *N. coriiceps* showed positive alteration on glycogen phosphorylase activity (2h) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (6h) and negative alteration in glucose-6-phosphatase (2,24-72h) and phosphofructokinase (72h). Oxidative stress in front of the heating *N. coriiceps* was responsible for a positive modulation of catalase (12, 144h), glutathione peroxidase (12h) and glutathione-S-transferase (6,72h). *N. rossii* negatively changed glutathione-S-transferase (2,12h), glutathione reductase (2h) and glutathione peroxidase (6-12h) and positively changed glutathione peroxidase (72-144h). The activities of citrate synthase, malate dehydrogenase and superoxide dismutase activity, as well as, the level of nonprotein thiols and malondialdehyde showed no alterations related to heating in both species. We observed that *N. rossii* and *N. coriiceps*, phylogenetically closely related species, have different metabolic responses against heat stress.

Keywords: Antarctic teleost, Nototheniidae, brain tissue, carbohydrate metabolism, oxidative stress, neurotransmission, high temperatures, Antarctica.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mapa da área de estudo..... | 15 |
| Figura 2. Gráficos sobre a predominância dos Nototenídeos na Antártica..... | 17 |
| Figura 3. Foto dos peixes antárticos: <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia coriiceps</i> | 17 |
| Figura 4. Representação esquemática da ação da hexoquinase..... | 25 |
| Figura 5. Representação esquemática da ação da glicose-6-fosfatase..... | 26 |
| Figura 6. Representação esquemática da ação da fosfofrutoquinase..... | 27 |
| Figura 7. Representação esquemática da ação da citrato sintase | 27 |
| Figura 8. Representação esquemática da ação da malato desidrogenase..... | 28 |
| Figura 9. Representação esquemática da ação da lactato desidrogenase..... | 29 |
| Figura 10. Representação esquemática da ação da glicogênio fosforilase..... | 29 |
| Figura 11. Representação esquemática da via das pentoses fosfato..... | 30 |
| Figura 12. Representação esquemática da ação da superóxido dismutase..... | 31 |
| Figura 13. Representação esquemática da ação da catalase..... | 31 |
| Figura 14. Representação esquemática da biossíntese da glutathione nas células..... | 32 |
| Figura 15. Representação esquemática da ação da glutathione peroxidase..... | 32 |
| Figura 16. Representação esquemática da ação da glutathione redutase..... | 33 |
| Figura 17. Representação esquemática da ação da glutathione-S-transferase | 33 |
| Figura 18. Representação esquemática da ação da acetilcolinesterase..... | 35 |
| Figura 19. Esquema do delineamento experimental..... | 38 |
| Figura 20. Foto da amostra encefálica de <i>N. coriiceps</i> | 39 |
| Figura 21. Níveis encefálicos da atividade da hexoquinase..... | 44 |
| Figura 22. Níveis encefálicos da atividade da fosfofrutoquinase..... | 45 |
| Figura 23. Níveis encefálicos da atividade da citrato..... | 45 |
| Figura 24. Níveis encefálicos da atividade da malato desidrogenase..... | 46 |
| Figura 25. Níveis encefálicos da atividade da lactato desidrogenase..... | 47 |
| Figura 26. Níveis encefálicos da atividade da glicose-6-fosfatase..... | 47 |
| Figura 27. Níveis encefálicos da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 28. Níveis encefálicos da atividade da glicogênio fosforilase | 49 |
| Figura 29. Níveis encefálicos da atividade da glutathione-S-transferase | 51 |
| Figura 30. Níveis encefálicos da atividade da glutathione peroxidase | 52 |
| Figura 31. Níveis encefálicos da atividade da glutathione redutase.... .. | 53 |
| Figura 32. Níveis encefálicos da atividade da catalase..... | 53 |
| Figura 33. Níveis encefálicos da atividade da superóxido dismutase..... | 54 |
| Figura 34. Níveis encefálicos de tióis não proteicos..... | 56 |
| Figura 35. Níveis encefálicos da malondialdeído..... | 57 |
| Figura 36. Níveis encefálicos da atividade da acetilcolinesterase..... | 58 |
| Figura 37. Representação do metabolismo encefálico com as enzimas e marcadores estudados neste trabalho..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resultados do teste ANOVA realizado para as enzimas do metabolismo de carboidratos..... | 49 |
| Tabela 2. Valores médio \pm erro-padrão das enzimas do metabolismo de carboidratos..... | 50 |
| Tabela 3. Resultados do teste ANOVA realizado para as enzimas do estresse oxidativo | 55 |
| Tabela 4. Valores médio \pm erro-padrão das enzimas do estresse oxidativo..... | 55 |
| Tabela 5. Resultados do teste ANOVA realizado para as moléculas malondialdeído e glutathione | 57 |
| Tabela 6. Valores médio \pm erro-padrão das moléculas malondialdeído e glutathione | 57 |
| Tabela 7. Resultados do teste ANOVA realizado para a enzima acetilcolinesterase | 59 |
| Tabela 8. Valores médio \pm erro-padrão da enzima acetilcolinesterase | 59 |
| Tabela 9. Resumo das alterações estatisticamente significativas das análises experimentais de <i>N. rossii</i> | 59 |
| Tabela 10. Resumo das alterações estatisticamente significativas das análises experimentais de <i>N. coriiceps</i> | 60 |

LISTA DAS PRINCIPAIS SIGLAS

CoA – coenzima A
ACC – Corrente Circumpolar Antártica
ACh - Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ALD - Aldolase
ATP – Adenosina trifosfato
AFGP – Glicoproteínas anticongelantes (do inglês *AntiFreeze GlicoProteins*)
ASMA – Área Antártica Especialmente Gerenciada
cMDH – Malato desidrogenase citoplasmática
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ChE - Colinesterase
CO₂ – Dióxido de carbono
CS – Citrato sintase
CTMax – Temperatura crítica máxima
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTNB – 5,5' – Ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico)
EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA – Ácido etileno diamino tetraacético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic acid*)
EROs – Espécies reativas de oxigênio
GAAM – Grupo de assessoramento Ambiental
G-6-Pase – Glicose-6-fosfatase
G-6-PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GR – Glutathione redutase
GP – Glicogênio fosforilase
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
GHHG – Glutathione oxidada
GST – Glutathione-S-transferase
HK - Hexoquinase

HOAD – 3-hidróxiacil-CoA desidrogenase
LDH – Lactato desidrogenase
LOOH – Hidroperóxidos lipídicos
LPO – Lipoperoxidação
MDA - Malondialdeído
MDH – Malato desidrogenase
MMA – Ministério do Meio Ambiente
mMDH – Malato desidrogenase da matriz mitocondrial
mRNA – RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato
PCO – Carbonilação de proteínas
Pi – Fosfato inorgânico
PFK – Fosfofrutoquinase
PROANTAR – Programa Antártico Brasileiro
SCAR – Comitê Científico sobre pesquisa Antártica (do *inglês Scientific Committee on Antarctic Research*)
SOD – Superóxido dismutase
TCA – Ácido tricarboxílico
TPI – Triose fosfato isomerase
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
U – Unidade Internacional de Enzimas
UFPR – Universidade Federal do Paraná
4-HNE – 4-hidroxinonenal

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. Estresse térmico em peixes | 18 |
| 1.2. Estresse térmico no encéfalo de peixes | 23 |
| 1.3. Biomarcadores e metabolismo de carboidratos | 25 |
| 1.4. Biomarcadores e estresse oxidativo | 30 |
| 1.5. Biomarcadores e neurotransmissão | 34 |
| 2. OBJETIVOS | 36 |
| 2.1. Objetivo geral | 36 |
| 2.2. Objetivos específicos | 37 |
| 3. Materiais e Métodos | 37 |
| 3.1. Coleta e aclimatação | 37 |
| 3.2. Delineamento experimental | 38 |
| 3.3. Procedimentos analíticos | 39 |
| 3.3.1. Determinação das enzimas do metabolismo de carboidratos | 40 |
| 3.3.2. Determinação das enzimas antioxidantes | 42 |
| 3.3.3. Determinação de lipoperoxidação e concentração de tióis não proteicos | 42 |
| 3.3.4. Determinação da atividade da acetilcolinesterase | 43 |
| 3.4. Análises estatísticas | 43 |
| 4. RESULTADOS | 44 |
| 4.1. Enzimas do metabolismo carboidratos | 44 |
| 4.2. Enzimas do sistema antioxidante | 50 |
| 4.3. Concentração de tióis não proteicos e níveis de lipoperoxidação | 56 |
| 4.4. Acetilcolinesterase | 58 |
| 5. DISCUSSÃO | 60 |
| 6. CONCLUSÃO | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |
| ANEXOS | 87 |

1. INTRODUÇÃO

A Antártica oferece um laboratório natural único para a realização de pesquisas sobre a relação entre o clima e os seres vivos, pois este ambiente possui características físicas que estão no limite para a vida (CLARKE *et al.*, 2007).

A geração de conhecimentos científicos sobre a Antártica e o oceano Austral garante papel ativo ao Brasil nas decisões sobre a preservação ambiental e o futuro do continente, em conformidade com o Tratado Antártico e o Protocolo de Madri. A ilha Rei George (Figura 1), onde se localiza a Baía do Almirantado e a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), locais deste estudo, é um Sítio Especial de Interesse Científico (SSSI N° 8) e uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA). Dentre as várias linhas de investigações que o Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) desenvolve na região, estão às pesquisas sobre a origem e evolução da biodiversidade Antártica, sua distribuição e a relação entre os organismos e o ambiente enfatizando a ação antrópica.

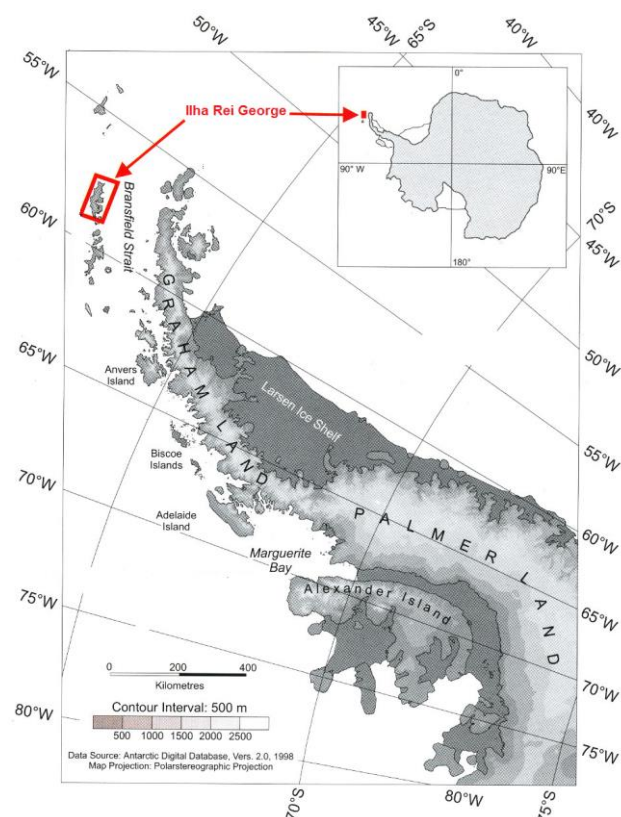


Figura 1: Área de estudo: Continente antártico, Península Antártica e em vermelho a ilha Rei George. Fonte: Imcoast (2015) - modificada pela autora.

O oceano Antártico, que representa 10% dos oceanos do mundo (EASTMAN, 2005), tem a peculiaridade de ter uma zona claramente delimitada, denominada de Zona Frontal Polar, também conhecida como Zona de Convergência Antártica (CLARKE e JOHNSTON, 1996). A Corrente Circumpolar Antártica (ACC) teve o seu desenvolvimento dependente de mudanças nos padrões de circulação atmosférica, em grande parte influenciada pelo isolamento progressivo da Antártica, devido à abertura tectônica com o sul da Austrália e da América do Sul (PFUHL e McCAYE, 2005). Com essas mudanças tectônicas, oceanográficas e climáticas ocorreu o isolamento da Antártica e como consequências houve a redução da temperatura, alterações no habitat e mudanças nas condições tróficas (EASTMAN, 2005). Concomitantemente, a ictiofauna também mudou de diversa, cosmopolita e temperada para taxonomicamente restrita, endêmica e polar (EASTMAN e McCUNE, 2000).

As águas costeiras do continente antártico e ilhas sub-antárticas (CAMPBELL *et al.*, 2008) são conhecidas por terem um alto nível de espécies endêmicas, dentre essas, muitas espécies de nototenídeos (GRIFFITHS *et al.*, 2009; GRIFFITHS, 2010). Nos últimos 10 a 13 milhões anos, os nototenídeos passaram por períodos extraordinários de evolução e se adaptaram a um ambiente marinho muito frio (temperatura varia entre $-1,8^{\circ}\text{C}$ e $+1,5^{\circ}\text{C}$) e altamente oxigenado (>320 mmol/Kg em 50m de profundidade), sendo assim considerados modelos atraentes para se estudar fisiologia e adaptação evolutiva (GRIFFITHS, 2010; SHIN *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2014). Este grupo de peixes tem sido extremamente bem sucedido no oceano Antártico, e em nenhum outro ecossistema oceânico é encontrado tal abundância, dada por um único grupo taxonômico de peixes (CLARKE e JOHNSTON, 1996). Essa subordem representa 76,6% da diversidade de espécies e 91,6% da biomassa existente na Antártica (Figura 2) (SHIN *et al.*, 2012).

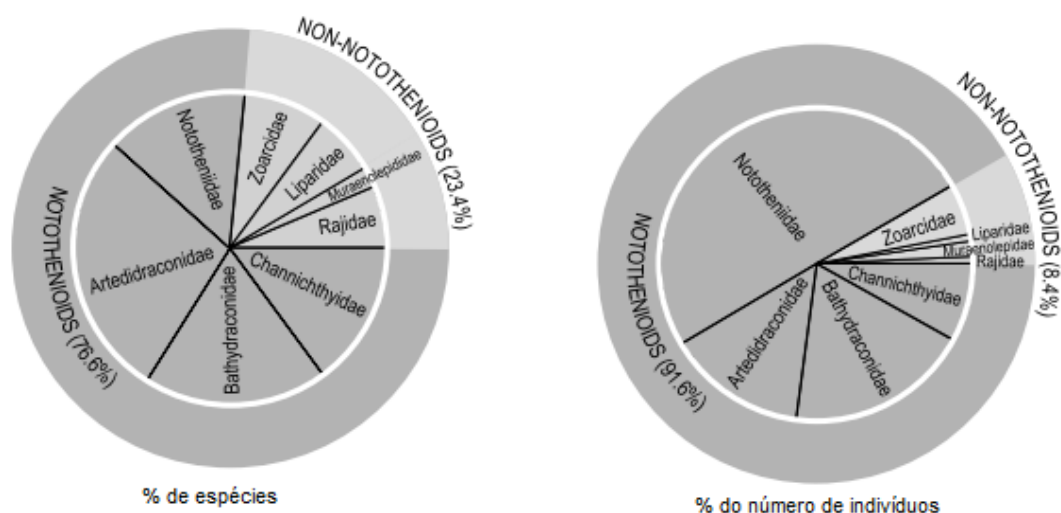


Figura 2: Gráficos que ilustram a predominância dos nototenídeos da Antártica. Fonte: Eastman (2005) - modificada pela autora.

Fazendo parte da família Nototheniidae, mais abundantes entre os nototenídeos, estão às espécies *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* (Figura 3) sendo estas o foco do presente trabalho. Estas espécies compõem grande parte da ictiofauna presente na Baía do Almirantado, estando entre as quatro mais abundantes (CASAUX *et al.*, 1990; SKORA e NEYELOV, 1992). Sendo os nototenídeos um grupo com grande biomassa, estes desempenham um significativo papel na cadeia alimentar da região, ocupando muitos dos nichos disponíveis e também servindo como alimento para os predadores de topo (LA MESA *et al.*, 2004). *N. coriiceps* é considerada onívora, sendo sua alimentação dependente da disponibilidade da presa (CASAUX *et al.*, 2003). Já *N. rossii* varia sua dieta alimentar ao longo do seu ciclo de vida (KNOX, 1994). Acrescida a esta característica, *N. rossii* apresenta importância comercial, o que maximiza o interesse científico nesta espécie (KAMLER *et al.*, 2001). As duas espécies estão muito próximas filogeneticamente (NEAR *et al.*, 2004), porém, algumas respostas metabólicas diferem, por exemplo, quando submetidas ao estresse térmico, como descrito em: Krebsbach (2014) nos rins, Pedreiro (2014) nos eritrócitos e Machado *et al.* (2014) no fígado ou em condições naturais como descrito por Raga *et al.* (2015).

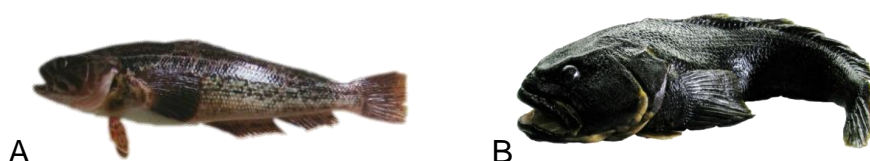


Figura 3: Foto dos peixes antárticos: *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B). Fonte: (A) – Donatti (2009) e (B) - Pedreiro (2011).

1.1. Estresse térmico em peixes

Em peixes a resposta ao estresse é considerada um mecanismo adaptativo, que permite ao animal lidar com os estressores, a fim de manter seu estado normal ou homeostático (BARTON, 2002). Se o agente estressor for muito intenso ou duradouro e os mecanismos de resposta forem solicitados além dos limites normais, isso pode se tornar prejudicial ao peixe (BARTON e IWAMA, 1991; BARTON, 2002). Segundo Moberg¹ (1985, citado por BARTON e IWAMA, 1991) a resposta ao estresse pode ser dividida em três fases: o reconhecimento da ameaça à homeostase, a própria resposta ao estresse e por último as consequências desse estresse. Cada fase possui eventos biológicos distintos que são iniciados pela percepção do estressor pelo sistema nervoso central (BARTON e IWAMA, 1991). A primeira etapa envolve as respostas neuroendócrinas, que incluem a liberação de catecolaminas e de hormônios corticosteroides na corrente sanguínea. As respostas secundárias incluem mudanças na concentração do plasma, nos níveis de metabólitos, nas características hematológicas e nas proteínas de estresse (HSPs), as quais se relacionam com os ajustes fisiológicos, como no metabolismo, na respiração, no equilíbrio ácido-base/hidromineral, na função imune e nas respostas celulares. Em sequência as respostas terciárias se referem ao animal como um todo, com alterações no crescimento, na resistência à doença, no comportamento, e em última análise, na sobrevivência. Afetando os peixes em todos os níveis de organização (BARTON e IWAMA, 1991; BARTON, 2002; HERAS *et al.*, 2015).

Mais de 20.000 espécies de peixes, animais ectotérmicos, possuem a temperatura do corpo associada diretamente com a temperatura da água (BEITINGER *et al.*, 2000), e os estudos a respeito dessa relação datam de mais de 170 anos (MORROW e MAURO, 1950). Assim, estes animais são vulneráveis as variações ambientais de temperatura, tornando esta última um fator abiótico vital que influencia sua distribuição geográfica ao longo do tempo evolutivo (VAN DIJK *et al.*, 1999; BEITINGER *et al.*, 2000; BASU *et al.*, 2002).

A resposta ao estresse térmico é importante para o crescimento e a sobrevivência desses animais (YAMASHITA *et al.*, 2010). As mudanças

fisiológicas decorrentes da variação da temperatura corporal resultam em alterações na taxa metabólica e ajustes bioquímicos, o que permite atender as necessidades de um nível metabólico estável (MARICONDI-MASSARI *et al.*, 1998; LERMEN *et al.*, 2004). Dentre os biomarcadores mais usados, que visam o entendimento de funções fisiológicas importantes relacionadas à manutenção do estado de saúde dos peixes, estão as enzimas antioxidantes, os parâmetros de dano oxidativo, as enzimas de neurotransmissão e as enzimas do metabolismo energético (VAN DER OOST *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2015). Os biomarcadores podem ser classificados em três classes: efeito, exposição e susceptibilidade. No presente trabalho foram utilizados biomarcadores de efeitos quando medimos os parâmetros de dano lipídico, avaliando assim, um efeito para saúde do peixe e biomarcadores de susceptibilidade quando avaliadas as enzimas antioxidantes e do metabolismo de carboidratos, mostrando a capacidade do organismo de responder a exposição (CHEN, *et al.*, 2005; NORDBERG, 2010 ; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os peixes antárticos possuem adaptações ao frio e capacidade para compensar os desafios fisiológicos peculiares a tal ambiente (BECKER *et al.*, 1995). O grau de tolerância térmica em peixes difere entre as espécies, temperatura de aclimação e tempo de exposição ao agente estressor (DAS *et al.*, 2005).

A variação térmica age como uma pressão ambiental capaz de provocar estresse, e este podem ser superado, através da capacidade adaptativa do organismo ao promover ajustes comportamentais e fisiológicos (BILYK e DEVRIES, 2011). Mesmo com evidências de que os peixes antárticos são capazes de aclimatar-se frente a um aumento da temperatura, há pouca informação sobre os efeitos nos diferentes modelos celulares e teciduais (ENZOR e PLACE, 2014).

A capacidade que um organismo possui de realizar processos metabólicos a baixas temperaturas (<4°C) tem como uma das causas evolutivas a biossíntese de glicoproteínas anticongelantes (AFGP) no sangue (FIELDS e DEVRIES, 2015). As AFGP são responsáveis pela manutenção da viscosidade dos fluidos biológicos dos peixes antárticos, dificultando a formação dos cristais de gelo, evitando desta forma o congelamento (HARRISON *et al.*, 1987; PECK, 2015). Peixes antárticos são únicos quando

analisamos a osmolaridade do plasma, com aproximadamente 600 mOsm/kg, comparados aos peixes marinhos de clima temperado que tem uma osmolaridade sérica de aproximadamente 330 mOsm/kg (O'GRADY e DEVRIES, 1982; BRAUER *et al.*, 2005; PETZEL, 2005). Peixes antárticos também possuem modificações no grau de insaturação dos ácidos graxos que constituem as membranas biológicas, assegurando que estas se mantenham mais fluidas e funcionais levando em consideração as restrições impostas pelo ambiente térmico (GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995). Outra característica marcante dos peixes antárticos foi a alteração na estrutura primária das proteínas, conduzindo a mudanças conformacionais em enzimas (MARTINEZ, 2013), podendo estas serem mais ativas em baixas temperaturas se comparadas às enzimas de peixes de águas mais quentes (KAWALL *et al.*, 2002).

Diferenças enzimáticas entre organismos que vivem em ambientes frios, como a Antártica e organismos hipertermófilos podem ser exemplificadas quando analisamos as implicações biológicas da enzima citrato sintase (CS). A CS de um organismo antártico possui sítio ativo mais acessível, além do seu potencial predominantemente negativo que serve para concentrar seus substratos eletrostaticamente para o sítio ativo, que está carregado positivamente. Uma maior mobilidade do domínio menor em comparação com o domínio maior da enzima pode permitir a sua capacidade catalítica a baixas temperaturas (RUSSEL *et al.*, 1998). Diferenças neste caso se refletem nos parâmetros cinéticos da associação da enzima com o substrato.

Em estudo realizado com o peixe antártico *Pachycara brachycephalum* foi observado a reorganização metabólica hepática durante a aclimação à 5°C ao longo de seis semanas, com o aumento de 90% da atividade da citocromo c oxidase, sugerindo diferentes vias metabólicas empregadas pelos peixes antárticos, quando comparados com peixes temperados. Enquanto isso, a atividade da CS reduziu em 20%, indicando uma mudança metabólica sobre lipídios e carboidratos (WINDISCH *et al.*, 2011). Em estudo com o nototênídeo antártico, *Trematomus bernacchii*, para se avaliar os efeitos da aclimação térmica a 4,5°C por 14 dias no tecido muscular cardíaco observou-se diminuição na atividade da enzima HOAD (3-hidróxiacil-CoA desidrogenase), implicando em redução na lise de ácidos graxos empregados como

combustível metabólico. No entanto, essa redução pode ser capaz de compensar os efeitos diretos da temperatura nos processos metabólicos. Também foi observado que os níveis das enzimas CS e lactado desidrogenase (LDH) diminuíram, sugerindo uma redução da produção de ATP cardíaco. Essa resposta parcial suporta a hipótese de que a redução da capacidade de aclimação cardíaca pode desempenhar um papel limitante na plasticidade térmica de *T. bernacchii* (JAYASUNDARA *et al.*, 2013). Análises da aclimação térmica a 4°C no músculo peitoral de outro nototenídeo antártico, *Pagothenia borchgrevinki*, mostraram que esta espécie não perdeu a capacidade de responder as mudanças ambientais. Essa espécie regula os processos metabólicos que ocorrem principalmente durante a fosforilação oxidativa, possivelmente para satisfazer os custos de se viver em temperaturas mais elevadas. Determinando assim, um novo olhar sobre a plasticidade térmica nos processos fisiológicos de peixes antárticos (SEEBACHER *et al.*, 2005). A osmolaridade sérica e íons inorgânicos séricos foram estudados em *T. bernacchii* e *T. newnesi* durante cinco semanas em aclimação de 4°C, e observou-se que houve um declínio na osmolaridade sérica de ambas as espécies, aumentando assim o gradiente osmótico entre o fluido extracelular e a água do mar, resultando na compensação positiva de Na⁺/K⁺-ATPase nas brânquias e nos rins (GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995).

Apesar dos peixes polares estarem adaptados a ambientes frios, estudos indicam que estas espécies são sensíveis ao estresse oxidativo (causado, por exemplo, pelo estresse térmico), provocando assim, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em níveis elevados e/ou uma diminuição do seu sistema antioxidante (ABELE e PUNTARULO, 2004). As EROs são formadas como subprodutos normais do metabolismo celular, e as vezes podem ser também geradas por oxidases em respostas a fatores de crescimento e citocinas e podem servir como mensageiros secundários em vias de sinalização específicas (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de geração de EROs excede o da sua remoção (SIES, 1997). Entre as consequências da ação desse estresse pode ocorrer a oxidação de proteínas, DNA, bem como a peroxidação de lipídios insaturados nas membranas celulares, induzindo perda da integridade celular (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa

que pode atuar no agente antes que ele cause a lesão ou reparando a lesão ocorrida (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Além de enzimas, a lipoperoxidação (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO) também podem ser avaliadas e utilizadas como indicadores de estresse oxidativo (LIMA e ABDALLA, 2001; LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006a).

Um estudo para determinar a capacidade de ajuste do metabolismo de defesa antioxidante no fígado de *N. coriiceps* e *N. rossii* foi realizado expondo os animais a 1, 3 e 6 dias a temperatura de 8°C. Observou-se que o nível da atividade da glutathione-S-transferase (GST) e malondialdeído (MDA) diminuíram e o da glutathione (GSH) aumentou apenas em *N. rossii* como consequência do aquecimento (MACHADO *et al.*, 2014). Mueller e colaboradores (2011) verificaram que as mitocôndrias de músculo cardíaco de *icefishes* apresentam densidades mais elevadas de fosfolipídios por grama de proteína mitocondrial quando comparado com peixes de sangue vermelho. Estes resultados permitem postular que isso pode torná-los mais vulneráveis ao estresse oxidativo frente ao aumento da temperatura. Em uma comparação realizada com peixes de sangue vermelho e *icefishes* submetidos a sua temperatura crítica máxima (CTMax), Mueller e colaboradores 2012 verificaram que os *icefishes* tiveram os níveis de proteínas e lipídios oxidados aumentados no músculo cardíaco em resposta ao aquecimento. Esses danos oxidativos podem contribuir com a reduzida tolerância térmica dos *icefishes*. Enzor e Place (2014) analisaram os efeitos do aumento da temperatura e da pressão parcial de CO₂ em *T. bernacchii*, *P. borchgrevinki* e *T. newnesi*. Os autores sugerem que alguns nototenídeos atualmente mantêm a capacidade antioxidante necessária para compensar as variações nas condições adversas oceânicas que podem surgir futuramente. Porém, mais estudos precisam ser realizados, pois não está claro se essa capacidade de resolução desse problema vem com efeitos fisiológicos que acarretam outro.

O estresse térmico pode acarretar também a alteração da atividade da acetilcolinesterase (AChE), porém os dados da literatura não são consistentes (CAILLEAUD *et al.*, 2007; DURIEUX *et al.*, 2011). A AChE é uma enzima chave do sistema nervoso central e onde sua principal função é remover o neurotransmissor acetilcolina da sinapse através da sua hidrólise (DURIEUX *et al.*, 2011). Alterações na atividade da AChE acarretam mudanças

comportamentais no peixe, como a variação da velocidade de natação, que quando reduzida pode ter graves consequências na sua sobrevivência (BEAUVAIS *et al.*, 2001; SCOTT e SLOMAN, 2004; DURIEUX *et al.*, 2011).

Embora vários trabalhos tenham sido conduzidos com teleósteos antárticos a fim de se demonstrar e/ou determinar a janela térmica e os ajustes metabólicos realizados por esses organismos frente ao aumento da temperatura, ainda existem lacunas a serem preenchidas. Mudanças nas janelas térmicas, transições em nível molecular e os efeitos nos diferentes modelos celulares e teciduais necessitam de maiores estudos.

1.2. Estresse térmico no encéfalo de peixes

O processamento neural exige alto gasto de energia, e as demandas metabólicas podem ter profunda influência sobre a estrutura, função e evolução dos sistemas de sinalização de células, neurônios, circuitos neurais e códigos neurais (LAUGHLIN *et al.*, 1998).

Segundo as informações disponíveis na literatura, a oxidação de glicose e a fosforilação oxidativa fornecem a maior parte do ATP para o funcionamento do cérebro em teleósteos (SOENGAS e ALDEGUNDE, 2002). Aumentos na atividade máxima das enzimas hexoquinase (HK) e fosfofrutoquinase (PFK), no tecido cerebral, estão correlacionados com dependência deste por glicose como fonte primária de energia. Esta dependência pode ser reforçada por alterações no metabolismo de carboidratos em respostas a mudanças no estado fisiológico dos animais, como o gerado por situações de estresse (LUSHCHAK *et al.*, 1998). Pesquisas indicam que o lactato também é uma importante fonte de energia no metabolismo do cérebro, sendo uma das hipóteses do seu uso, um possível papel energético em astrócitos, devido as enzimas da gliconeogênese dessas células (DRINGEN *et al.*, 1993).

Outra fonte de energia em vertebrados é o glicogênio, empregado quando os níveis de glicose diminuem. O cérebro tem a capacidade de sintetizar e degradar glicogênio (MOON e MOMMSEN, 1987), mas quando comparado com o fígado e músculo, este o faz em baixas concentrações, sendo esta a maior reserva de energia disponível do sistema nervoso central (DRINGEN *et al.*, 1993). Alguns peixes não empregam dependência total de carboidratos

externos para o metabolismo cerebral, tendo assim, o glicogênio como uma importante fonte de energia, principalmente em situações de estresse como descrito em *Carassius carassius*, uma espécie de água doce (VORNANEN e PAAJANEN, 2006).

Vários fatores ambientais podem alterar as principais vias do metabolismo energético do cérebro de teleósteos. A adaptação ao frio pode causar mudanças no aporte ao substrato, logo a função neural pode ser afetada pelas variações de temperatura (SOENGAS e ALDEGUNDE, 2002). As enzimas LDH e CS de cérebros de peixes antárticos são mais ativas em baixas temperaturas quando comparadas com o metabolismo enzimático destas enzimas em peixes tropicais, que vivem em ambientes mais quentes (KAWALL *et al.*, 2002), sugerindo que existe uma compensação parcial da temperatura (SOENGAS e ALDEGUNDE, 2002). Em estudo, *in vitro*, com encéfalo de três nototênídeos antárticos observou-se que o metabolismo cerebral possui uma relação direta com dados de temperatura letal (6°C), sugerindo que a sensibilidade térmica do sistema nervoso central pode ser de fundamental importância na determinação da tolerância térmica das espécies (SOMERO e DEVRIES, 1967).

Em *C. carassius* um estudo sobre aclimação (quente e frio) em diferentes temperaturas no cérebro mostrou mudanças significativas relacionadas a composição molecular dos lipídeos da membrana, onde os lipídeos insaturados podem ser necessários para manter a fluidez dependendo da temperatura de aclimação (KÄKELÄ *et al.*, 2008).

A alta taxa metabólica das células do cérebro implica em uma alta produção de EROs (BLOMGREN e HAGBERG, 2006), por alterações no transporte de elétrons da membrana mitocondrial interna (TSENG *et al.*, 2011), como o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) (ANSALDO *et al.*, 2000).

Estudos com cérebro de *C. auratus* mostraram que transições de (alta e baixa) temperatura afetam a atividade das enzimas antioxidantes e os níveis de LPO e PCO (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006a). Em experimento de choque térmico (35°C), envolvendo a mesma espécie, observou-se que o nível de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), foi fortemente afetada, havendo o aumento de 4 vezes nos níveis da SOD cerebral, mas estes níveis

foram revertidos na temperatura de recuperação (21°C) (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006b).

1.3. Biomarcadores e metabolismo de carboidratos

A disponibilidade de energia do peixe, dada pela ingestão de alimentos, pode ser repartida em diversas funções vitais, sendo os custos das funções básicas supridos primeiramente seguidos pela alocação de energia para o crescimento e reprodução, fatores estes cruciais na abundância e distribuição da população (SANDERSFELD *et al.*, 2015). Pörtner e Knust (2007) têm associado limites de tolerância térmica com abundância das espécies, mostrando a importância de se conhecer os efeitos da temperatura sobre a alocação de energia nos peixes. Porém, os conhecimentos dos mecanismos que permitem mudanças metabólicas durante aclimação térmica de peixes ainda são escassos. Assim nosso trabalho contempla o estudo de algumas enzimas chave do metabolismo de carboidratos.

A hexoquinase (HK), enzima regulatória da via glicolítica, realiza a fosforilação (ATP é doador de um grupo fosforil) da glicose no grupo hidroxil de forma irreversível, produzindo glicose-6-fosfato, sendo este o primeiro e importante passo para a utilização da glicose (GONZÁLEZ-ALVALEZ *et al.*, 2009; NELSON e COX, 2011). A glicose-6-fosfato é substrato para diferentes vias metabólicas, dependendo do status metabólico e do tipo celular (Figura 4) (LI *et al.*, 2014). A HK tem seis genes no peixe modelo *zebrafish*, sendo o gene DrHXK1 (isoforma hexoquinase I) mais expresso no encéfalo (GONZÁLEZ-ALVALEZ *et al.*, 2009).

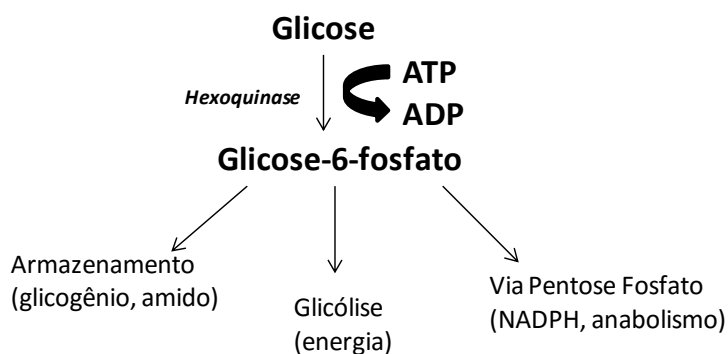


Figura 4: Fosforilação pela hexoquinase, passo comum para diferentes vias do metabolismo da glicose. Fonte: Wilson (2003) - modificado pela autora.

A enzima que faz a reação inversa da HK é a glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) (NELSON e COX, 2011), que catalisa a hidrólise de glicose-6-fosfato em glicose e fosfato inorgânico (Pi) realizando a reação final da gliconeogênese (MITHIEUX, 1997; NELSON e COX, 2011). Ativada por Mg^{2+} é encontrada no lúmen do retículo endoplasmático (Figura 5) (NELSON e COX, 2011). Sua baixa atividade tem sido relatada, porém existe atividade da G-6-Pase em vários tecidos de peixes (SASTRY e SHARMA, 1980; MITHIEUX, 1997; PANSEERAT *et al.*, 2000), no entanto é expressa em quantidades significativas principalmente no fígado e no córtex renal, conferindo a esses tecidos gliconeogênicos a capacidade para regular a homeostase da glicose no sangue (MITHIEUX, 1997).

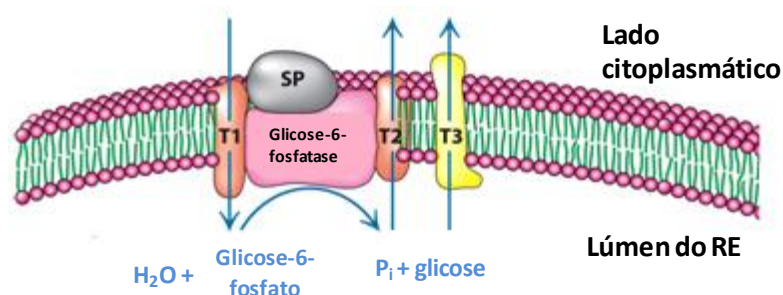


Figura 5: Reação catalisada pela glicose-6-fosfatase, essa reação não requer a síntese de ATP, sendo a hidrólise simples de uma ligação éster fosfato. Fonte: Berg *et al.* (2012) – modificado pela autora.

A enzima fosfofrutoquinase (PFK) realiza a terceira etapa da glicólise, considerada a segunda das reações preparatórias/regulatórias desta via (Figura 6). A PFK catalisa a transferência de um grupo fosforil do ATP para a frutose-6-fosfato, formando a frutose-1,6-bifosfato. O produto formado desta reação tem como destino exclusivamente a glicólise, fato que denomina esta etapa de “fase comprometida” (NELSON e COX, 2011). A alta atividade da PFK observada em encéfalo de algumas espécies de teleósteos suporta a afirmação de um alto potencial glicolítico no tecido encefálico (SOENGAS e ALDEGUNDE, 2002).

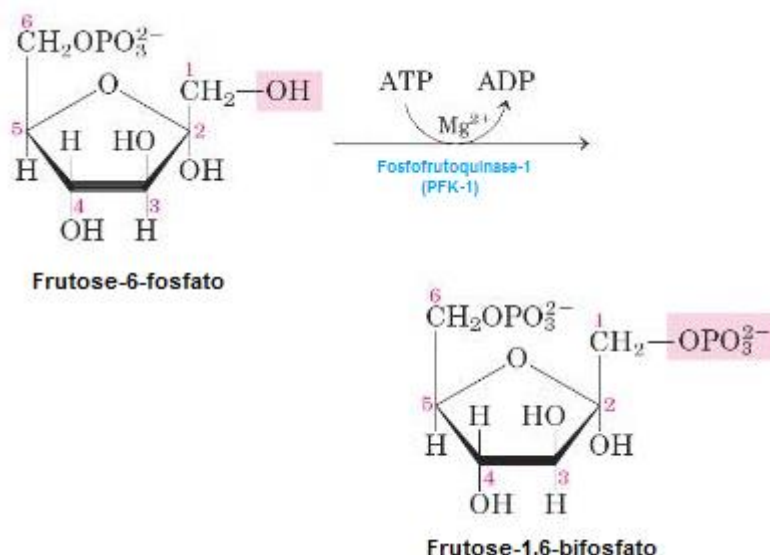


Figura 6: Representação esquemática da catalisação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato pela fosfofrutoquinase. Fonte: Nelson e Cox (2011) - modificado pela autora.

A capacidade aeróbica pode ser determinada pela atividade da enzima citrato sintase (CS), a primeira enzima do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), localizada na matriz mitocondrial (GAGNON e HOLDWAY, 1999). A CS catalisa a reação de condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato para formar citrato, passo que controla a velocidade de funcionamento do TCA (Figura 7) (NELSON e COX, 2011; RODRIGUES Jr. *et al.*, 2015). Idealmente a capacidade da atividade da CS reflete na entrada de acetil-CoA no TCA após a oxidação de ácidos graxos e carboidratos, e variações na sua atividade pode indicar mudanças no metabolismo aeróbico em respostas a alterações de fatores abióticos (STROBEL *et al.*, 2013).

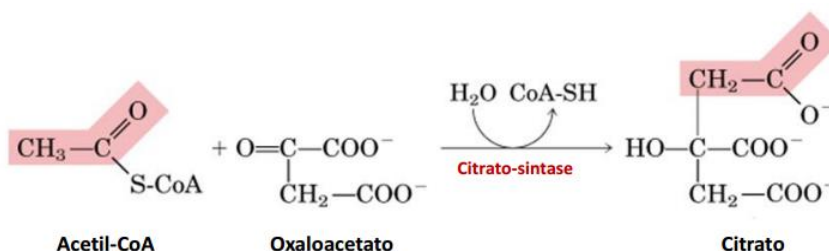


Figura 7: Representação esquemática da ação da citrato sintase na formação do citrato. Fonte: Nelson e Cox (2011).

A enzima malato desidrogenase (MDH) realiza a última reação do ciclo tricarboxílico, ligada ao NAD⁺, e catalisa a oxidação do malato em oxaloacetato, conservando o nível deste último na célula (Figura 8) (NELSON e COX, 2011). As células eucarióticas contêm duas formas de enzimas MDH – uma na matriz mitocondrial (mMDH) e outra citoplasmática (cMDH) (MUSRATI

et al., 1998). Em peixes as isoenzimas da MDH são geralmente codificadas por três locus gênicos (BASAGLIA, 1989). A maior e mais variável atividade da MDH em relação à CS mostra que esta exerce variadas funções (SULLIVAN e SOMERO, 1980). A oxidação do malato pela MDH em oxaloacetato, a síntese de aminoácidos, a gliconeogênese, o próprio TCA, a manutenção do balanço redox e sua relação com o transporte de metabólitos entre citoplasma e organelas são algumas das funções (GIETL, 1992; MUSRATI *et al.*, 1998; NELSON e COX, 2011).

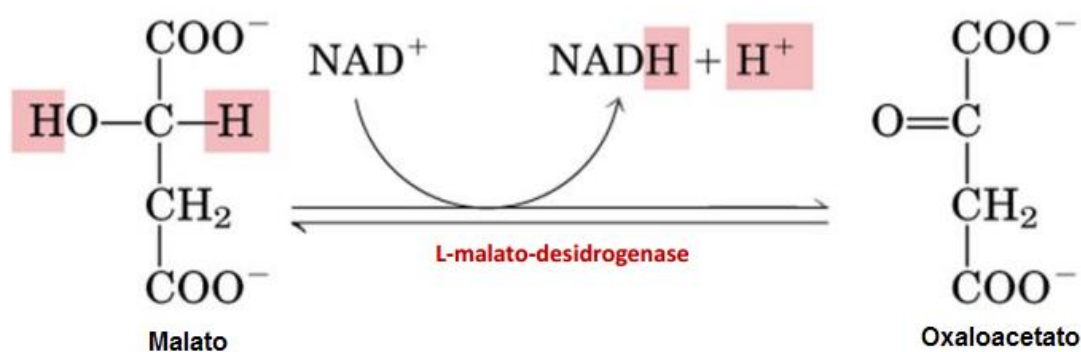


Figura 8: Representação esquemática da ação da malato desidrogenase na regeneração do oxaloacetato. Fonte: Nelson e Cox (2011) - modificado pela autora.

Quando o tecido encefálico não pode suprir-se com oxigênio suficiente para suportar a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH, o NAD⁺ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a lactato (NELSON e COX, 2011). O tecido encefálico também produz uma pequena quantidade de lactato quando está em repouso e bem oxigenado (SOENGAS e ALDEGUNDE, 2002). A redução do piruvato é catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), enzima terminal da glicólise anaeróbica localizada no citosol (Figura 9) (STOREY, 2015). Assim, a LDH é utilizada como biomarcador do funcionamento da via anaeróbica (NELSON e COX, 2011). Peixes teleósteos possuem pelo menos três locus de codificação genética para as subunidades da LDH, LDH-A, LDH-B e LDH-C. A isoforma LDH-C₄ é sintetizada principalmente em regiões do sistema nervoso relacionadas com os olhos (COPPES, 1992). A LDH tem sido usada como modelo na investigação dos efeitos da temperatura sobre a catálise enzimática (STOREY, 2015).

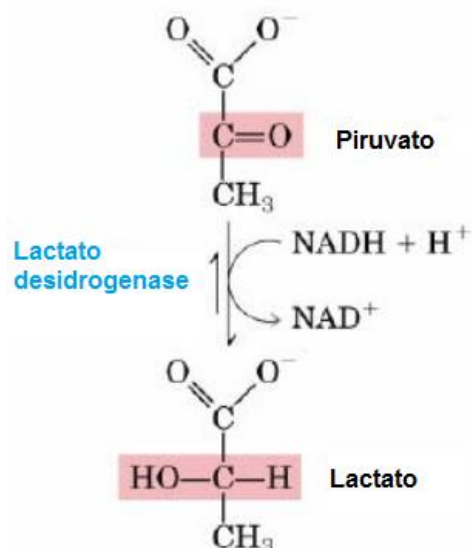


Figura 9: Representação esquemática da ação da lactato desidrogenase. Fonte: Nelson e Cox (2011) - modificado pela autora.

A glicólise armazenada em forma de glicogênio ganha entrada na via glicolítica primeiramente pela ação da glicogênio fosforilase (GP), que catalisa a reação em que uma ligação glicosídica no glicogênio sofre ação do fosfato inorgânico (Figura 10), removendo o resíduo terminal de glicose formando a glicose-1-fosfato (NELSON e COX, 2011). A GP apresenta as isoformas GP_a, fosforilada (mais ativa) e a GP_b, não fosforilada (menos ativa) (DONNIER-MARÉCHAL e VIDAL, 2016). Esta enzima tem um papel indicativo da atividade de glicogenólise em peixes (RODRIGUES Jr. *et al.*, 2015).

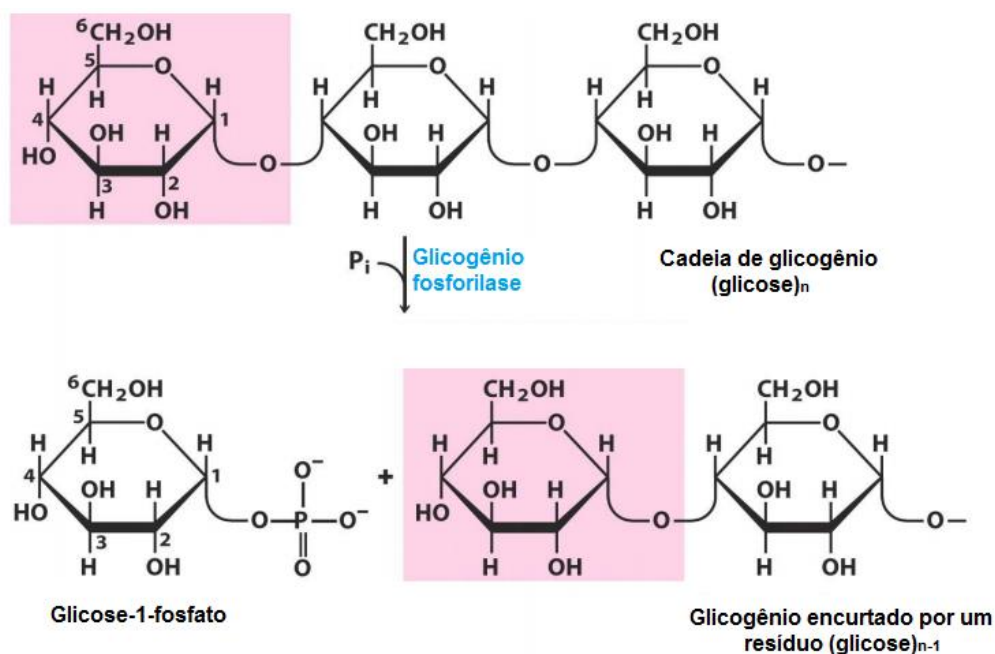


Figura 10: Representação esquemática da ação da glicogênio fosforilase. Fonte: Nelson e Cox (2011) - modificado pela autora.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) catalisa o primeiro passo, ou seja, a ativação da via das pentoses fosfato a qual produz NADPH. O resultado líquido dessa via é a produção de NADPH para as reações de redução biossintéticas e a produção de ribose-5-fosfato como precursora para a síntese de nucleotídeos (Figura 11) (NELSON e COX, 2011; KUZU *et al.*, 2015). O NADPH é um poderoso agente redutor para todas as células e é cofator requerido para a atividade de duas enzimas a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), envolvidas na eliminação de peróxido de hidrogênio, auxiliando a célula a resistir contra o estresse oxidativo (CASTRO *et al.*, 2015).

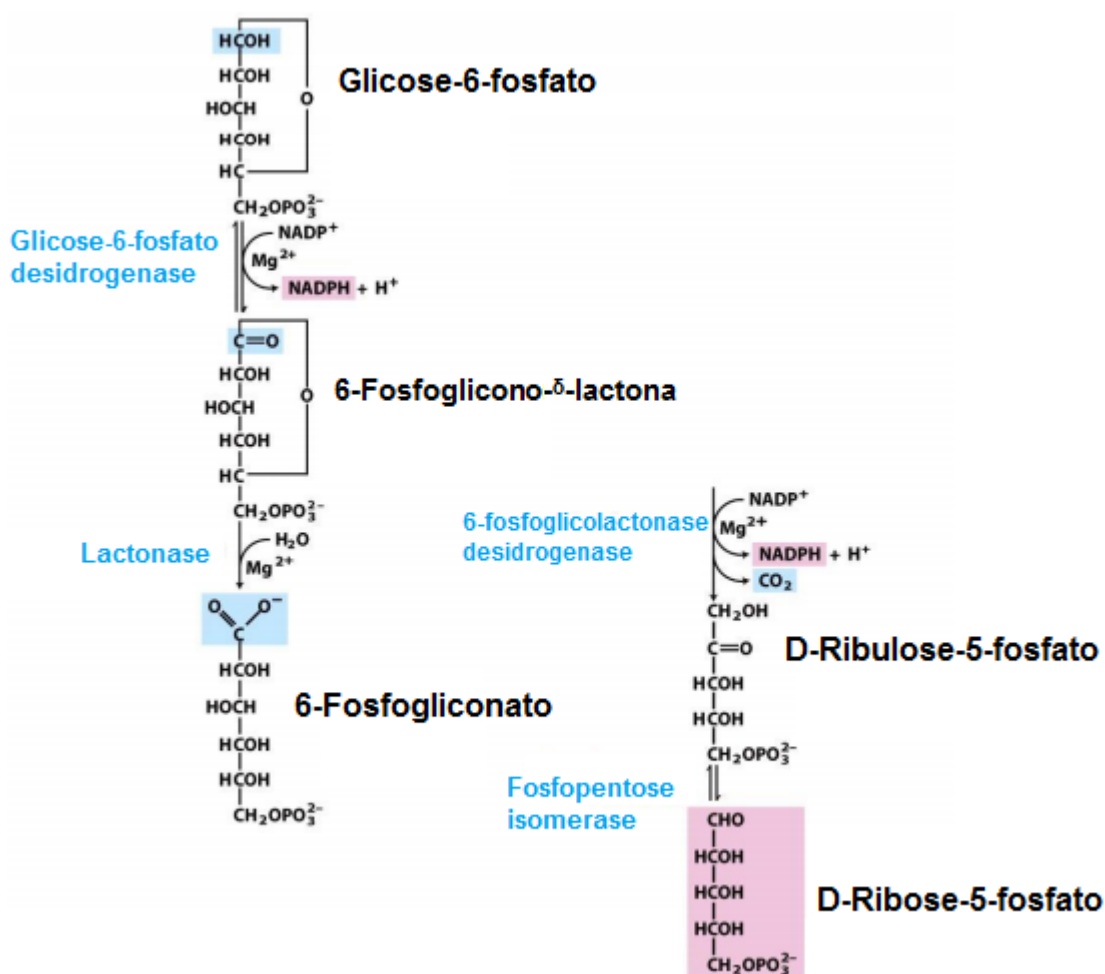


Figura 11: Representação esquemática da via das pentoses. Fonte: Nelson e Cox (2011).

1.4. Biomarcadores e estresse oxidativo

Atribuído a maior solubilidade do oxigênio em águas frias, os peixes antárticos possuem uma alta concentração de oxigênio em seus tecidos, e

consequentemente, podemos esperar níveis mais elevados na produção de EROs (ALSALDO *et al.*, 2000) e das enzimas antioxidantes (ABELE e PUNTAROLO, 2004). Embora adaptados às condições do ambiente polar estes peixes são sensíveis ao estresse oxidativo causados por outros fatores de estresse, como a variação da temperatura (ABELE e PUNTAROLO, 2004; MACHADO *et al.*, 2014). A atividade e a expressão de enzimas antioxidantes, assim como outros marcadores não enzimáticos de estresse oxidativo são temas de pesquisas realizadas para a avaliação dos organismos antárticos submetidos a estresse térmico (MUELLER *et al.*, 2012; ENZOR e PLACE, 2014; MACHADO *et al.*, 2014).

A superóxido dismutase (SOD), primeira enzima na linha de defesa antioxidante (BOWLER *et al.*, 1992), considerada também uma das mais especializadas (DORVAL e HONTELA, 2003), está presente em praticamente todos os organismos aeróbicos e compartimentos celulares onde é provável que ocorra o estresse oxidativo (BOWLER *et al.*, 1992). A SOD é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Figura 12) (MODESTO e MARTINEZ, 2010).



Figura 12: Representação esquemática da ação da superóxido dismutase. Fonte: a autora (2016).

O peróxido de hidrogênio, em seguida, é degradado em água e oxigênio molecular (Figura 13) através da ação da enzima catalase (CAT) (MODESTO e MARTINEZ, 2010). A CAT é uma heme proteína localizada predominantemente em peroxissomos (MRUK *et al.*, 2002). A CAT associada com outras enzimas antioxidantes (como a SOD e glutathione redutase e peroxidase) é capaz de remover, neutralizar ou eliminar as EROs (TKACHENKO *et al.*, 2014).



Figura 13: Representação esquemática da ação da catalase. Fonte: a autora (2016).

A glutathione (GSH), um tripeptídeo encontrado frequentemente em níveis altos, é derivada dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (Figura 14).

Essa molécula é encontrada com prevalência nos compostos chamados de tióis não proteicos. Esta molécula possui papel central nas defesas das células contra o estresse oxidativo, além de atuar na biotransformação e eliminação de xenobióticos (HUBER *et al.*, 2008), sendo considerada assim um antioxidante não enzimático (MODESTO e MARTIZ, 2010). Sua forma oxidada (GSSG) é composta de duas moléculas de glutathiona ligadas através de uma ligação dissulfeto (NELSON e COX, 2011).

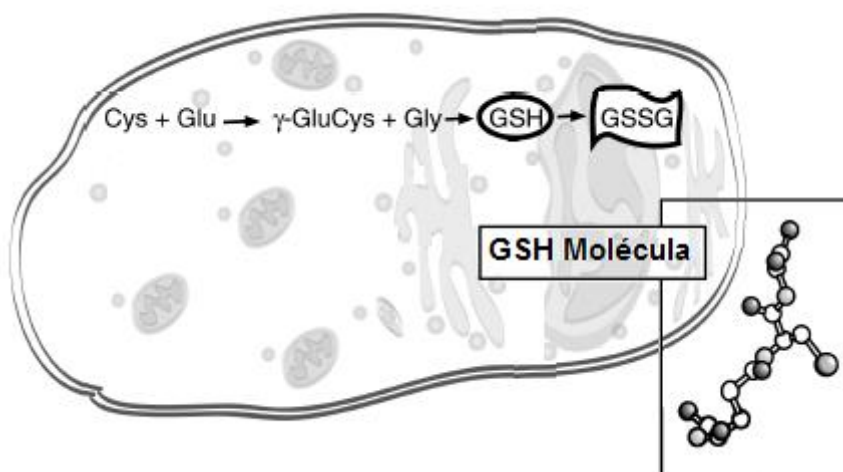


Figura 14: Representação esquemática da biossíntese da glutathiona nas células e as formas GSH e GSSG. Fonte: Hermes-Lima (2004) – modificado pela autora.

A GSH também é utilizada na remoção de peróxidos tóxicos formados em condições aeróbicas, sendo esta reação catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), realizando a oxidação de GSH à GSSG (Figura 14) (HUBER *et al.*, 2008).

A GPx tem a peculiaridade de ter em sua constituição um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo (NELSON e COX, 2011). A GPx pertence a uma família de enzimas antioxidantes que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos lipídicos (Figura 15), oriundos da ação de radicais livres (ROVER JR *et al.*, 2001; SATTIN *et al.*, 2015).

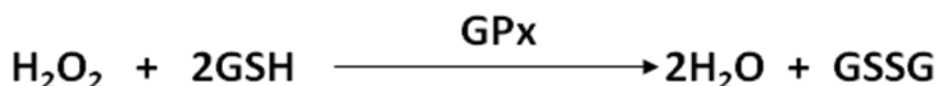


Figura 15: Representação esquemática da redução do peróxido de hidrogênio em água, reação catalisada pela glutathiona peroxidase. Fonte: a autora (2015).

A glutathiona redutase (GR) é uma enzima crítica para a redução da GSSG de volta para GSH (Figura 16). Nessa reação é utilizado NADPH como agente redutor para reduzir uma GSSG para duas GSH (ESPINOSA-DIEZ *et*

al., 2015), impedindo assim a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER JR *et al.*, 2001).

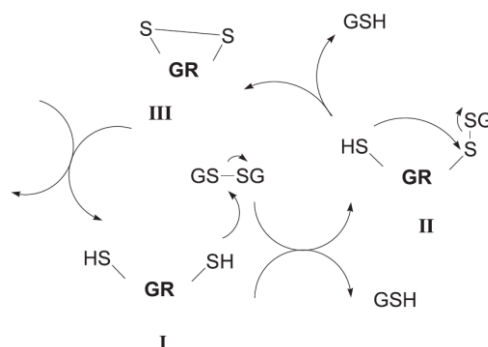


Figura 16: Representação esquemática da redução da GSSG pela glutathiona redutase. Fonte: Huber *et al.* (2008).

A GSH ainda é usada como cofator para a ação da enzima glutathiona-S-transferase (GST) (MODESTO e MARTIZ, 2010). As glutathionas transferases, fazem parte de uma família de enzimas multifuncionais, sendo as principais enzimas de desintoxicação de fase II e encontradas principalmente no citosol (SHEEHAN *et al.*, 2001). A GST catalisa (Figura 17) a ligação da forma reduzida da glutathiona com compostos que apresentam carbono, nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HUBER *et al.*, 2008), eliminando mais facilmente, compostos xenobióticos e produtos da lipoperoxidação associados à glutathionas (ROVER JR *et al.*, 2001; MODESTO e MARTINEZ, 2010).

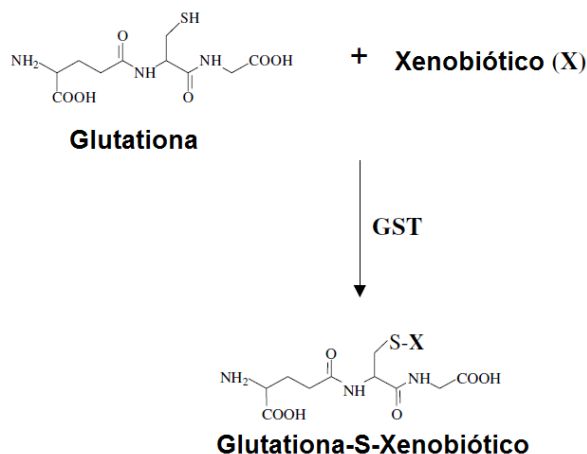


Figura 17: Representação esquemática da conjugação de um xenobiótico (X) com glutathiona-S-transferase resultando no complexo conjugado de glutathiona-S. Fonte: Townsend e Tew (2003) – modificado pela autora.

A lipoperoxidação (LPO) é a reação de lipídeos com EROs, resultando na formação de hidroperóxidos de lipídeos (L'UBOMÍRA *et al.*, 2015). O radical hidroxila (OH•) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos recentes indicam que

o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar $\text{Fe}^{+++} : \text{Fe}^{++}$ no meio, para que ocorra a lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em resposta a LPO da membrana a célula pode estimular a sua manutenção e sobrevivência através de sistemas de defesas antioxidantes, resultando em uma resposta de estresse adaptativo ou ainda induzir a morte celular quando a extensão dos danos supera a capacidade de reparação (AYALA *et al.*, 2014). Essa reação entre lipídeos e EROs produz uma grande variedade de produtos, sendo o principal produto primário os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e entre os diferentes aldeídos secundários que podem ser formados encontramos: malondialdeído (MDA), propanal, hexanal, e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (ESTERBAUER *et al.*, 1982; POLI *et al.*, 1985). O marcador mais estudado de peroxidação de lipídeos é o MDA (L'UBOMÍRA *et al.*, 2015), pois além de ser um biomarcador de estresse oxidativo, tem grande capacidade mutagênica, sendo altamente reativo e tóxico (GIERA *et al.*, 2012; AYALA *et al.*, 2014).

1.5. Biomarcadores e neurotransmissão

A colinesterase é uma enzima que está envolvida no controle temporal da transmissão do impulso nervoso através de hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em numerosas vias dos sistemas nervoso central e periférico (COLOVIC *et al.*, 2013). Os vertebrados possuem duas colinesterases (ChE), correspondentes a dois distintos genes, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (MASSOULIÉ *et al.*, 1993; POHANKA, 2012), a última também chamada de pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A AChE, uma das enzimas analisadas neste trabalho, é predominantemente encontrada nos músculos e no sistema nervoso, onde é geralmente acompanhada por um nível mais baixo de BChE, especialmente nos primeiros estágios de desenvolvimento. A BChE também é expressa em outros tecidos e mais notavelmente sintetizada no fígado e secretada no plasma (MASSOULIÉ *et al.*, 1993; ASSIS *et al.*, 2011). O papel fisiológico da AChE no sistema nervoso está mais esclarecido, já o da BChE, pouco se sabe

sobre suas funções (KOZLOVSKA *et al.*, 1993). Em peixes teleósteos, a predominância de ChE no encéfalo consiste quase que exclusivamente em AChE, enquanto que no músculo pode variar de apenas AChE ou AChE e BChE, dependendo da espécie (LEIBEL, 1988; KOZLOVSKA *et al.*, 1993; STURM *et al.*, 2000). Devido ao importante papel que a AChE desempenha no controle da transmissão do impulso nervoso pelo neurotransmissor ACh, essa enzima tem sido um alvo para estudos baseados no seu mecanismo e função (QUINN, 1987).

A ACh é sintetizada pela colina-acetiltransferase e a captação de ACh ocorre através de uma bomba de energia (próton) que acidifica a vesícula. Ela é liberada na fenda sináptica e liga-se a receptores da membrana pós-sináptica. A AChE finaliza a transmissão do sinal hidrolisando a ACh e formando colina e acetato (Figura 18). A colina liberada retorna ao neurônio pré-sináptico e uma nova ACh é sintetizada através da reação com a acetil-CoA através da ação da colina-acetiltransferase (COLOVIC *et al.*, 2013).

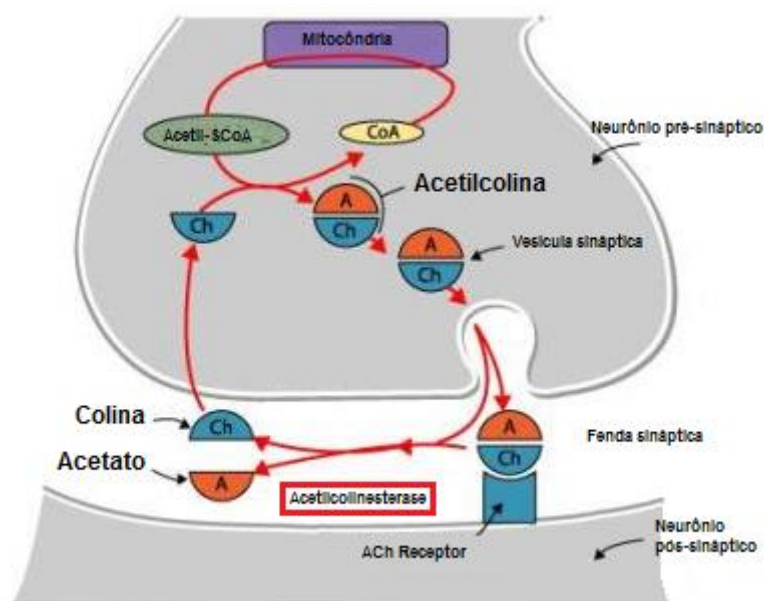


Figura 18: Mecanismo de síntese da acetilcolina (ACh) e ação da acetilcolinesterase (AChE) na neurotransmissão. Fonte: <http://www.ierfh.org/br.txt/Nootropicos2009.html> - modificado pela autora.

A AChE, considerada uma das enzimas chave do sistema nervoso, é o biomarcador de neurotoxicidade mais utilizado em organismos aquáticos (HOGAN, 1970; BALDWIN *et al.*, 2009; CHUIKO *et al.*, 1997; DURIEUX *et al.*, 2011). A AChE é alvo de compostos como os organofosforados e carbamatos comumente usados mundialmente como inseticidas (WANG *et al.*, 2015). Estes

inseticidas possuem atividade anticolinesterásica, resultando na acumulação de acetilcolina nas sinapses, o que provoca perturbações no sistema nervoso dos organismos, e finalmente o comprometimento comportamental (equilíbrio, natação, forrageamento e migração) reduzindo assim a sobrevivência, levando a efeitos no nível populacional (BALDWIN *et al.*, 2009; DURIEUX *et al.*, 2011).

A atividade da AChE é muito variável entre espécies de peixes (BOCQUENÉ *et al.*, 1990), assim as diferenças de respostas entre as espécies frente a fatores naturais devem ser consideradas (DURIEUX *et al.*, 2011), como por exemplo a temperatura da água (BEAUVAIS *et al.*, 2001).

A cinética enzimática da AChE cerebral de dois peixes antárticos, em condições naturais, foi estudada verificando a maior atividade em temperaturas de 18° e 37°C, *Notothenia gibberifrons* e *Pseudochaenichthys georgianus* respectivamente, apesar de ambas viverem em uma mesma temperatura média, mostrando o efeito diferenciado da variação da temperatura sobre a cinética enzimática da AChE (NIEMIENKO, 1978). Durieux e colaboradores (2011) analisaram os efeitos de fatores naturais – temperatura – na atividade da AChE do peixe estuarino *Morone saxatilis*, ao longo de alguns meses do ano. Neste estudo observaram diminuição progressiva de 60% da atividade da AChE nos meses de inverno quando comparado com o período de verão. Mostrando assim, uma alta correlação entre a atividade da AChE e a temperatura da água nesta espécie. Chuiko e colaboradores (1997) encontraram, também em um estudo sazonal, com o peixe dulcícola *Rutilus rutilus*, um alto nível na atividade da AChE no período de verão, onde a temperatura das águas é máxima, o que coincide com o período reprodutivo da espécie. Concluíram que este aumento está relacionado com os ritmos circadianos, os quais por sua vez estão relacionados principalmente com a temperatura ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as respostas metabólicas do encéfalo de peixes antárticos (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) submetidos ao estresse térmico.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos no encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico;
- Quantificar os níveis de atividade das enzimas antioxidantes no encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico;
- Quantificar os biomarcadores de estresse oxidativos em e da concentração de tióis não proteicos no encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico;
- Quantificar os níveis de atividade da acetilcolinesterase no encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coletas e aclimação

Exemplares de *N. rossii* e *N. coriiceps* foram coletados, com linha e anzol e auxílio de botes pneumáticos, a uma profundidade de aproximadamente 10 a 25 metros, na Baía do Almirantado (61°S e 63°30'S; 53°55'W e 62°50'W), Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica.

Os peixes foram mantidos, na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) em tanques de fibra de vidro de 1000L durante 3 dias em condições controladas de salinidade ($35 \pm 1,0$ psu), temperatura ($0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12 horas luz/12 horas escuro) e aeração constante. A água foi renovada 50% a cada 48 horas com água do mar captada a uma profundidade de 4 metros em frente à EACF. A alimentação oferecida foi à base de músculo de peixes antárticos, a cada dois dias (48 horas) na quantidade correspondente a 1% da massa corpórea. Animais que não se alimentaram durante 72 horas foram descartados.

As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental (GAAM) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Código de Conduta do Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (*Scientific Committee on Antarctic Research* - SCAR) foi utilizado na manipulação e sacrifício dos

animais. Esta pesquisa foi registrada no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob os n° 496 e 840.

3.2. Delineamento experimental

Posteriormente a aclimação, espécimes de *N. coriiceps* (número de indivíduos= 115; comprimento total= $38,17 \pm 4,28\text{cm}$; peso= $777,71 \pm 242,74\text{g}$) e *N. rossii* (número de indivíduos= 120; comprimento total= $33,9 \pm 3,47\text{cm}$; peso= $442,88 \pm 133,57\text{g}$), foram mantidos durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas em temperatura de $8^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e salinidade de 35 ± 1 psu sendo estes animais considerados os grupos experimentais (Figura 19). Os animais controles foram mantidos nas mesmas condições e tempos dos experimentais, com exceção da temperatura que foi de $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para cada situação experimental foram utilizados 10 indivíduos.

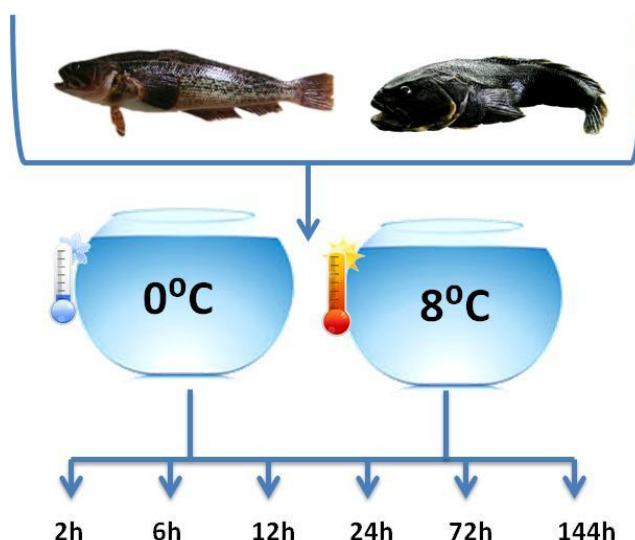


Figura 19: Esquema do delineamento experimental de *N. rossii* e *N. coriiceps* nas temperaturas de 0 e 8 °C pelo período de 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Fonte: A autora, 2016.

A temperatura das águas costeiras da Península Antártica varia entre -1,9°C a +2°C (EASTMAN, 1993; CHEN *et al.*, 1997) e, por esta razão neste trabalho determinou-se como temperatura controle 0°C. Já a temperatura de 8°C, conforme dados da literatura, encontra-se próximo a tolerância térmica de peixes antárticos (SOMERO e DEVRIES, 1967; RYAN, 1995; PÖRTNER *et al.*, 2004; LOWE e DAVISON, 2005; STROBEL *et al.*, 2013).

A temperatura da água foi controlada por termostatos Aquaterm 08 (*Full Cauge*), não havendo uma aclimação progressiva, mas sim um choque térmico. Foi fornecida aos peixes, a cada 48h durante os bioensaios, uma porção (correspondente a 1% da massa corpórea) de musculatura de peixes antárticos. A renovação de 50% da água dos tanques foi feita a cada 48 horas.

Ao fim de cada experimento os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% ($p v^{-1}$) e sacrificados com secção medular. Medidas biométricas (comprimento e peso) foram realizadas seguidas de imediata dissecação. Amostras de encéfalo (Figura 20) foram obtidas e armazenadas em tubos criogênicos e congeladas em nitrogênio líquido. O material foi transportado para o laboratório de Biologia Adaptativa da Universidade Federal do Paraná, onde foi armazenado, em ultrafreezer -80° e realizadas as análises.



Figura 20: Amostra do encéfalo de *Notothenia coriiceps*. Foto: a autora, 2015.

3.3. Procedimentos analíticos

As amostras de encéfalo foram pesadas e homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador motorizado Potter-Elvehjem. Em seguida, o homogeneizado foi sonificado (somente no processamento do metabolismo de carboidratos) durante 15 segundos para ruptura de estruturas subcelulares, como retículo endoplasmático e mitocôndria. O homogeneizado foi centrifugado em 12.000 rpm a $4^{\circ}C$ durante 20 min e o sobrenadante aliquoteado e utilizado para as análises bioquímicas. Os ensaios bioquímicos foram feitos em triplicata e as amostras permaneceram em gelo moído a $4^{\circ}C$.

As atividades enzimáticas foram padronizadas com base em métodos espectrofotométricos, adaptados para microplacas (com exceção da catalase

realizada em cubetas de quartzo), sendo realizadas no *Epoch Microplate Spectrophotometer* – Biotek.

Os testes realizados para medir os níveis das enzimas e marcadores foram padronizados em 20°C. A metodologia é comum em estudos que envolvem a atividade enzimática em peixes antárticos (JAYASUNDARA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2014; ALMROTH *et al.*, 2015). Lembrando que o objetivo deste trabalho não é a cinética enzimática, mas sim um estudo comparativo da atividade em diferentes temperaturas. Logo, nossos resultados podem ser comparados com outros resultados existentes na literatura e contribuir para a compreensão do efeito do estresse térmico sobre peixes da Antártica.

A concentração de proteínas, em solução, foi determinada pelo método de Bradford (1976), com leitura em microplacas a 595nm, utilizando-se a albumina bovina sérica como padrão. Os resultados foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática.

3.3.1. Determinação das enzimas do metabolismo de carboidratos

A determinação da atividade da enzima hexoquinase (HK) foi avaliada em 50 mM de tampão Imidazol (pH 7,4), contendo 2,0 mM de glicose, 2,0 mM de ATP, 10,0 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mM de NADP⁺, 1,0 mM de ditioneitol, 2,0 mM de cloreto de potássio e 0,3 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. A variação de absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 340nm pela formação de NADPH (BALDWIN *et al.*, 2007).

A atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi padronizada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,2), 10 mM de MgCl₂, 1,0 mM de ATP, 0,15 mM de NADH, 2,0 mM de AMP, 250 mM de KCl, 1 U/mL de gliceroifosfato desidrogenase (GPDH), 1,2 U/mL de aldolase (ALD), 10 U/mL de triose fosfato isomerase (TPI) e 5,0 mM de frutose-6-fosfato. A variação da absorbância pela oxidação do NADH foi medida em espectrofotômetro a 340 nm (BALDWIN *et al.*, 2007).

A lactato desidrogenase (LDH) foi determinada com o sistema de reação composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM, β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (β -

Nicotinamide adenine dinucleotide reduced - NADH) 0,254 mM. A reação foi medida espectrofotometricamente a 340 nm pela variação do NADH (THUESEN *et al.*, 2005).

A atividade da malato desidrogenase (MDH) foi determinada segundo o método proposto por Childress e Somero (1979). O sistema de reação foi composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM, NADH 150 μ M. A reação foi obtida espectrofotometricamente em 340 nm.

A atividade da citrato sintase (CS) foi determinada segundo o método descrito por Saborowski e Buchholz (2002), a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. Sendo que a reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio. O sistema de reação foi composto por tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), cloreto de potássio 100mM, EDTA 1 mM, 5,5'- Dítio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,2 mM, acetil Coenzima A 0,2 mM e oxaloacetato 0,5 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm.

A atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) foi medida pela formação de NADPH a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+). O meio de reação conteve tampão TRIS/HCl (100mM, pH 7,4) e NADP^+ 0,2 mM. Como substrato iniciador foi utilizado glicose-6-fosfato (1 mM). Método descrito por Glock e McClean (1953). O aumento da absorbância foi medido em 340nm.

A análise da atividade da glicogênio fosforilase (GP) seguiu o procedimento descrito por Milligan (2003) com algumas modificações propostas por Chang *et al.* (2007). A variação na absorbância, provocada pela formação de NADPH, nas reações com e sem glicogênio (substrato) foram medidas em espectrofotômetro a 340 nm.

A atividade da glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) foi determinada pelo método descontínuo descrito por Fathi *et al.* (2002). O meio de reação continha tampão Imidazol 100 mM (pH 7,4), ácido etileno diamino tetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) 1,8 mM, glicose-6-fosfato 26,5mM. Ao adicionar-se o reativo verde de malachita (molibdato de amônia, verde de malachita e Tween) a reação é interrompida. O fosfato inorgânico formado na reação foi medido espectrofotometricamente em 600 nm.

Maiores detalhes sobre as análises citadas acima podem ser visualizados no Anexo 1.

3.3.2. Determinação das enzimas antioxidantes

A determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi acompanhada através da oxidação de NADPH. A ação da enzima ocorre pela utilização da glutathione reduzida (GSH) para reduzir um peróxido orgânico, originando a glutathione dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela glutathione redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH (WENDEL, 1981). A leitura do consumo de NADPH foi realizada em espectrofotômetro a 340nm.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia de Keen *et al.* (1976) catalisando a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, formando um tioéter. A glutathionação do CDBN foi medida espectrofotometricamente em 340nm.

A atividade da glutathione redutase (GR) foi determinada através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathione dissulfídica (GSSG). O meio de reação contém tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,6), EDTA 5mM, NADPH 0,1mM e glutathione dissulfeto 1mM. A leitura do consumo de NADPH foi realizada em espectrofotômetro a 340nm (SIES *et al.*, 1979).

A análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi baseada na metodologia descrita por Crouch *et al.* (1981), onde a SOD inibia a redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$. Essa inibição foi medida através do aumento de absorbância em 560nm.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O meio de reação conteve tampão TRIS-HCl (1M, EDTA 5mM, pH 8,0) e peróxido de hidrogênio 10mM (AEBI, 1984). A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 240nm, em cubetas de quartzo.

Maiores detalhes sobre as análises citadas acima podem ser visualizados no Anexo 1.

3.3.3. Determinação de lipoperoxidação e concentração de tióis não proteicos

Para quantificação da peroxidação lipídica (LPO) no encéfalo, foi feita a avaliação pelos níveis dos produtos finais da LPO, o malondialdeído (MDA). A quantificação foi através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em especial, o MDA. Foram determinados espectrofotometricamente em 535 nm pela reação de TBARS, utilizando malondialdehyde-(bis)-acetate (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (FEDERICI *et al.*, 2007).

A análise da concentração de glutathiona (GSH) e outros tióis não proteicos foi realizada através do método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando produto que absorve luz a 415 nm.

3.3.4. Determinação da atividade da acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida de acordo com Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O princípio desta técnica consiste em expor o tecido homogeneizado e o reagente de cor DTNB-5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) ao substrato acetilcolina. Este substrato é hidrolisado pela AChE em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato, responsável pelo aparecimento da coloração amarelada, a qual é medida em espectrofotômetro a 405 nm. Na microplaca foi adicionado 20 µL de sobrenadante contendo 1 mg de proteína por ml, 130 µL de DTNB 0,75 mM e 50 µL de iodeto de acetilcolina 9 mM sobre cada alíquota.

3.4. Análises estatísticas

Nas análises estatísticas o teste de Levene foi utilizado, *a priori*, para verificar a homogeneidade das variâncias. Subsequentemente foram realizadas as análises de variância de duas-vias (ANOVA) para determinar o efeito das variáveis temperatura, tempo de exposição e a interação entre elas. O pós-teste de Tukey foi utilizado sempre que o teste "F" da ANOVA for significativo. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média).

4. RESULTADOS

4.1. Enzimas do metabolismo de carboidratos

Os níveis de atividade da HK em *N. rossii* (Figura 21A) foram negativos em 8°C em relação a 0°C em 12 horas de exposição e, nesse mesmo tempo foram encontradas diferenças em 0°C em relação aos demais tempos de exposição. Em *N. coriiceps* (Figura 21B), os níveis de atividade da HK, não foram alterados pelo aumento da temperatura a 8°C. Porém, houve interação entre temperatura e tempo de exposição em 8°C, ocorrendo aumento em 12 horas quando comparados com 6, 24 e 72 horas e diminuição em 144 horas quando comparados com os demais tempos. Em 0°C houve diminuição em 144 horas quando comparado com 2 e 6 horas.

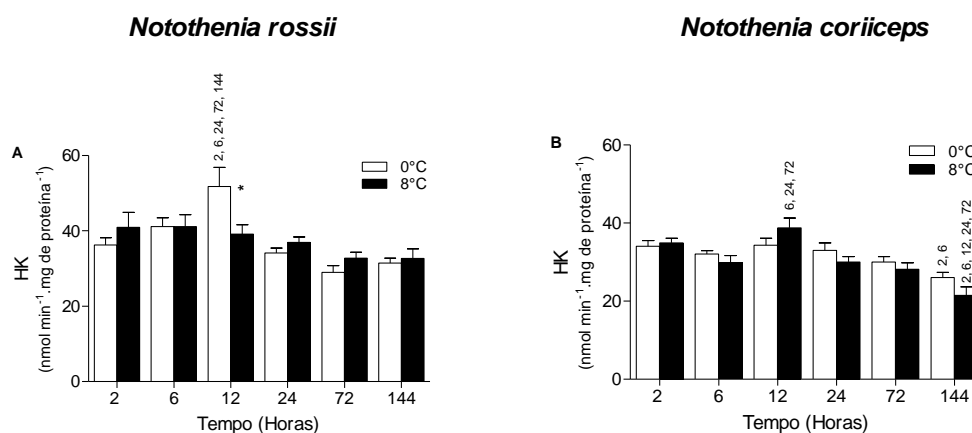


Figura 21: Níveis encefálicos de atividade da hexoquinase (HK). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A PFK (Figura 22A) em *N. rossii* não sofreu alterações estatísticas significativas de interação entre as temperaturas capazes de alterar os níveis de atividade da enzima. Em relação a variações nos tempos de exposição, observou-se que em 0°C ocorreu aumento gradativo até 12 horas. Já, em 8°C houve aumento em 12 horas quando comparado aos demais tempos e decréscimo em 24 horas se comparado a 2, 6 e 72 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 22B) em 72 horas de bioensaio, a atividade da PFK mostrou-se menor

em 8°C quando comparada ao controle. Ao longo do tempo, nos peixes mantidos a 0 e 8°C, os níveis de atividade da PFK foram maiores em 12 horas em comparação com os outros tempos experimentais.

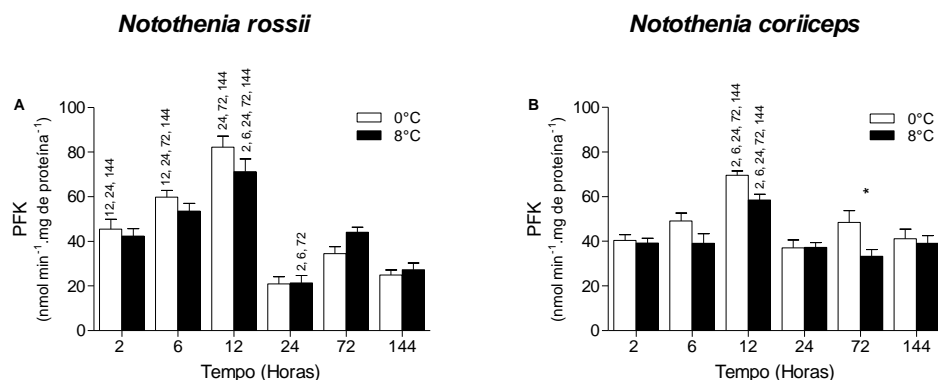


Figura 22: Níveis encefálicos de atividade da fosfofrutoquinase (PFK). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Os níveis de atividade da CS (Figuras 23A e 23B) em ambas as espécies não foram alterados pela temperatura. Entretanto, em *N. rossii* (Figura 23A) ao longo do tempo, em 8°C, houve aumento nos três primeiros tempos em relação aos três últimos tempos de exposição e em 0°C em 72 e 144 horas observou-se decréscimo quando comparados com as 24 horas iniciais de experimento.

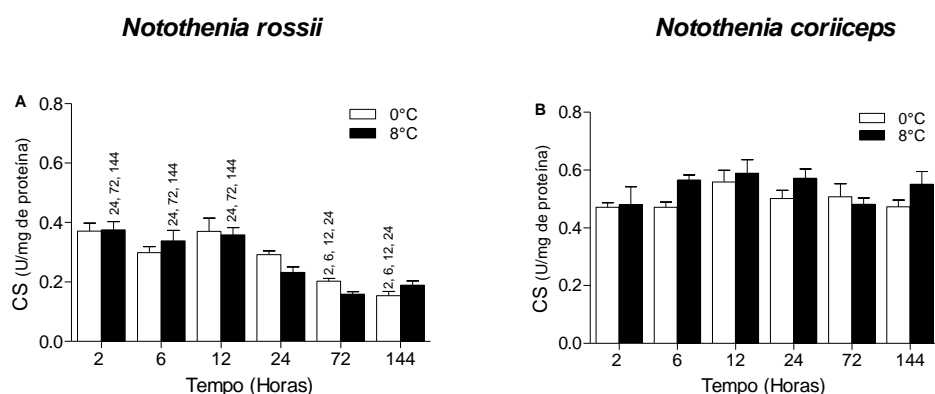


Figura 23: Níveis encefálicos de atividade da citrato sintase (CS). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em U/mg de proteína .

O aquecimento a 8°C não influenciou os níveis de atividade da MDH em relação à 0°C nas duas espécies analisadas (Figuras 24A e 24B), mas

apresentaram diferenças ao longo dos tempos de exposição. Em *N. rossii*, a 0°C, a MDH diminuiu (Figura 24A) em 144 horas em relação a 12 e 24 horas, enquanto que em 8°C neste mesmo tempo, observou-se diminuição quando comparado com 12 horas. Em *N. coriiceps*, a 0°C, a MDH diminuiu (Figura 24B) em 144 horas em relação a 12 horas e em 8°C aumentou em 6 e 12 horas quando comparada com os demais tempos analisados.

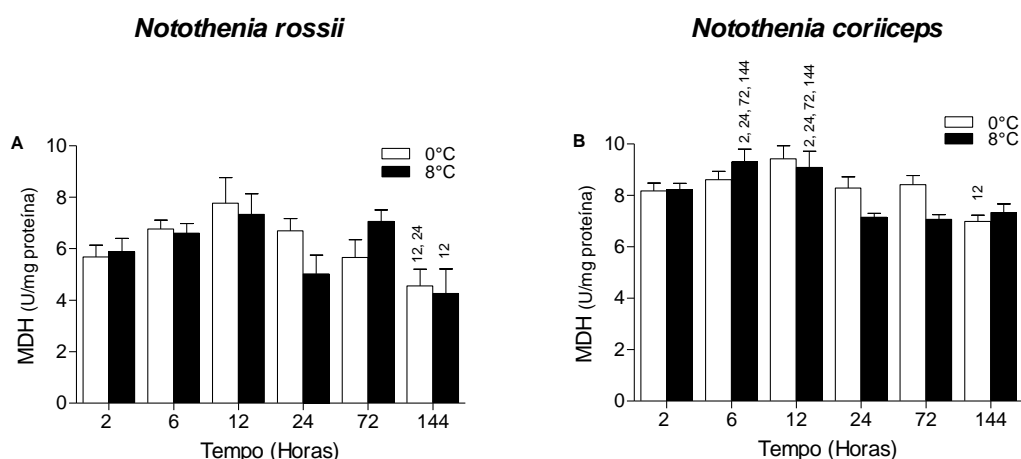


Figura 24: Níveis encefálicos de atividade da malato desidrogenase (MDH). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em U/mg de proteína.

Em *N. rossii* (Figura 25A), os níveis de atividade da LDH foram negativos em peixes mantidos por 2 e 6 horas em 8°C em relação ao controle (0°C). Ao longo do tempo de exposição em 0°C os níveis de LDH em 12 horas aumentaram em relação a 24, 72 e 144 horas. Já em 8°C houve aumento nos níveis de atividade em 12 horas quando comparados a 2, 6, 24 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 25B) não houve alterações nos níveis de atividade da LDH decorrentes do efeito da temperatura e da interação temperatura e tempo de exposição.

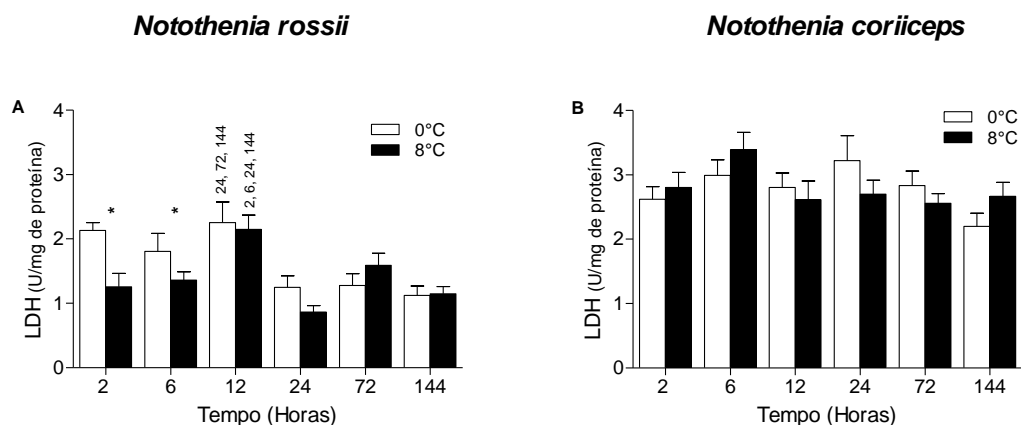


Figura 25: Níveis encefálicos de atividade lactato desidrogenase (LDH). Encéfalo de *Nototothenia rossii* (A) e *Nototothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em U/mg de proteína.

O aquecimento a 8°C, em *N. rossii*, alterou (Figura 26A) negativamente os níveis de atividade da G-6-Pase em 144 horas quando comparado com o controle. Ao longo dos tempos de exposição houve diminuição em 0°C em 72 horas em relação a 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 26B) o efeito da temperatura de 8°C foi observado em 2, 24 e 72 horas, onde em todos os tempos ocorreu redução da atividade da G-6-Pase quando comparada com 0°C. A interação entre o tempo e temperatura foi observada em 8°C, havendo diminuição dos níveis, em 2 horas, quando comparado com 6 e 24 horas e em 6 horas, aumento, quando comparado com 12 horas. Na temperatura controle (0°C) em 24 horas ocorreu aumento significativo quando comparado com os tempos de 2, 6, 12 e 144 horas.

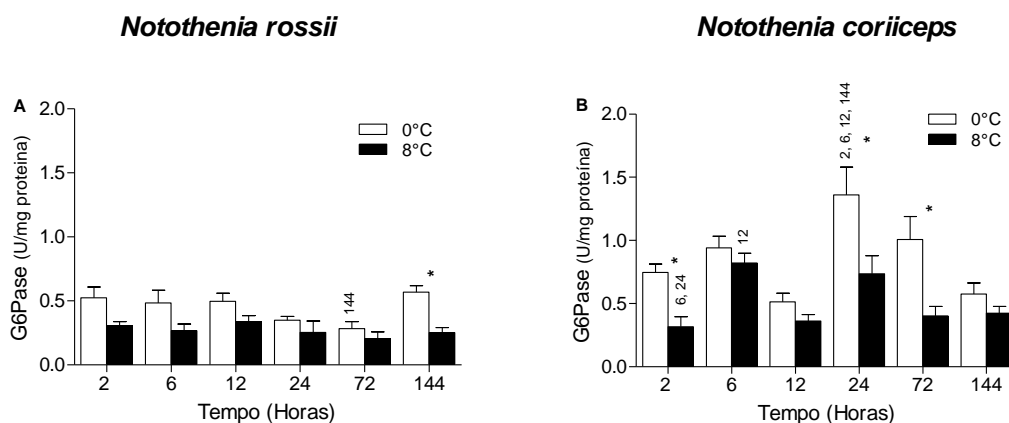


Figura 26: Níveis encefálicos de atividade da glicose-6-fosfato (G-6-Pase). Encéfalo de *Nototothenia rossii* (A) e *Nototothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra

preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em U/mg de proteína.

A atividade da enzima G-6-PDH, em *N. rossii* (Figura 27A) não sofreu alteração com o aquecimento a 8°C, apesar de ao longo do tempo ter um pequeno aumento em 0°C em 12 horas quando comparada com 24 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 27B) o aquecimento em 8°C alterou positivamente em relação a temperatura de 0°C em 6 horas. Ao longo do tempo houve maior atividade, em 0°C, em 2 horas quando comparada aos demais tempos de exposição. Em 8°C alterou positivamente em 2 horas comparado com 12-144 horas e em 6 horas quando comparada com 72 e 144 horas.

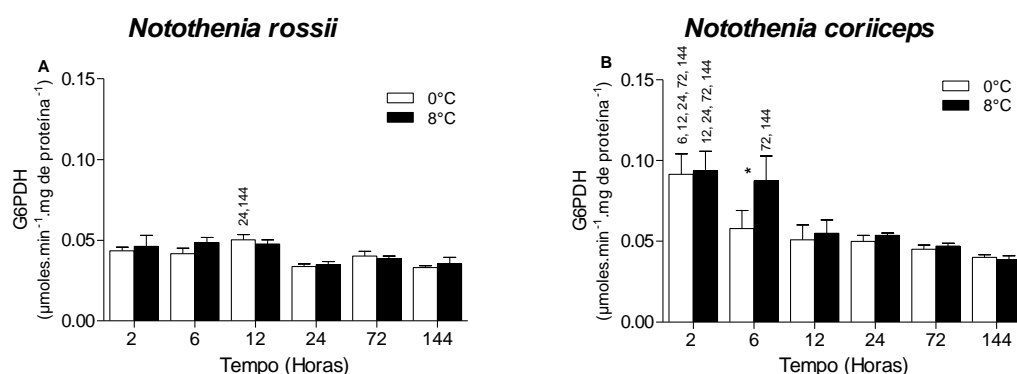


Figura 27: Níveis encefálicos de atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da enzima GP não sofreu alteração pelo aquecimento em *N. rossii* (Figura 28A), mas ao longo do tempo teve aumento significativo nas duas temperaturas em 2 horas em relação aos demais tempos. Em *N. coriiceps* (Figura 28B) houve alteração positiva em 2 horas decorrente do aquecimento. Ao longo do tempo, em 0°C os níveis de atividade da GP foram positivos em 24, 72 e 144 horas em relação as 12 primeiras horas. Na temperatura de 8°C os níveis foram negativos em 6 horas em relação a 2, 24, 72 e 144 horas, em 12 horas quando comparada com 2 horas, e em 144 horas quando comparada com 24 horas. Ocorreram também alterações positivas nos tempos de 24 e 72 horas em relação a 12 horas.

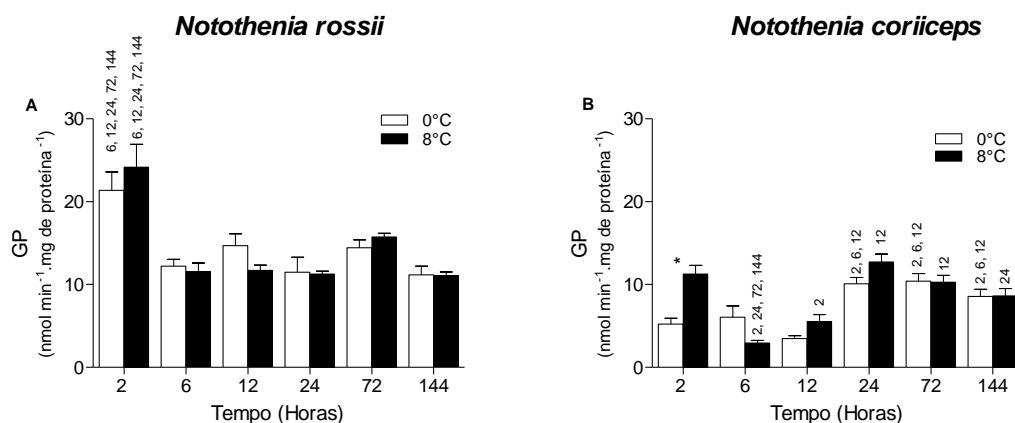


Figura 28: Níveis encefálicos de atividade da glicogênio fosforilase (GP). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Informações adicionais sobre os resultados do Teste de ANOVA das enzimas do metabolismo de carboidratos estão presentes na tabela 1 e os valores médios \pm erro padrão na tabela 2.

Tabela 1: Resultados do teste de ANOVA (duas-vias) realizado para as enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, HK (hexoquinase), PFK (fosfofrutoquinase), CS (citrato sintase), MDH (malato desidrogenase), LDH (lactato desidrogenase), G-6-Pase (glicose-6-fosfatase), G-6-PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) e GP (glicogênio fosforilase). Fatores: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas) para enzimas encefálicas de *Notothernia rossii* e *Notothernia coriiceps*. *Indica diferenças significativas.

| <i>Notothernia rossii</i> | | | | <i>Notothernia coriiceps</i> | | | |
|---------------------------|-------------|--------|---------|------------------------------|--------|---------|--------|
| | Temperatura | Tempo | TE x Ti | Temperatura | Tempo | TE x Ti | |
| HK | F | 0,00 | 9,05 | 2,93 | 1,17 | 14,48 | 1,81 |
| | p | 0,98 | <0,01* | 0,02* | 0,28 | <0,01* | 0,12* |
| PFK | F | 0,39 | 61,18 | 1,86 | 10,92 | 15,65 | 1,78 |
| | p | 0,53 | <0,01* | 0,11 | 0,01* | <0,01* | 0,12 |
| CS | F | 0,20 | 30,27 | 1,63 | 4,26 | 1,77 | 0,84 |
| | p | 0,65 | <0,01* | 0,16 | 0,04* | 0,12 | 0,52 |
| MDH | F | 0,19 | 5,29 | 1,21 | 1,92 | 9,28 | 2,50 |
| | p | 0,67 | <0,01* | 0,31 | 0,17 | <0,01* | 0,03* |
| LDH | F | 5,23 | 9,48 | 2,54 | 0,004 | 2,24 | 1,36 |
| | p | 0,02* | <0,01* | 0,03* | 0,95 | 0,06 | 0,25 |
| G-6-PDH | F | 0,67 | 6,93 | 0,54 | 1,97 | 12,23 | 0,92 |
| | p | 0,41 | <0,01* | 0,74 | 0,16 | <0,01* | 0,47 |
| G-6-Pase | F | 24,35 | 2,62 | 0,98 | 26,90 | 9,09 | 2,08 |
| | p | <0,01* | 0,03* | 0,43 | <0,01* | <0,01* | 0,07 |
| GP | F | 0,23 | 27,56 | 0,57 | 6,66 | 22,34 | 6,34 |
| | p | 0,63 | <0,01* | 0,72 | <0,01* | <0,01* | <0,01* |

Tabela 2: Valores médio \pm erro-padrão e número de indivíduos, entre parênteses, por temperatura e espécie para cada uma das enzimas avaliadas. Atividade das enzimas HK (hexoquinase), PFK (fosfofrutoquinase) e GP (glicogênio fosforilase) são expressas em nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹ e em μ mol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹ para CS (citrato sintase), MDH (malato desidrogenase), LDH (lactato desidrogenase), G-6-Pase (glicose-6-fosfatase) e G-6-PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase).

| | | <i>Notothenia rossii</i> | | <i>Notothenia coriiceps</i> | |
|----------|-----------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | | 0°C | 8°C | 0°C | 8°C |
| HK | 2 horas | 36,29 \pm 1,90 (10) | 40,95 \pm 3,97 (10) | 34,03 \pm 1,44 (9) | 34,93 \pm 1,19 (10) |
| | 6 horas | 41,18 \pm 2,27 (9) | 41,18 \pm 3,16 (10) | 32,05 \pm 0,87 (8) | 29,82 \pm 1,84 (9) |
| | 12 horas | 51,77 \pm 5,10 (8) | 39,12 \pm 2,53 (10) | 34,33 \pm 1,77 (9) | 38,80 \pm 2,46 (8) |
| | 24 horas | 34,13 \pm 1,35 (10) | 36,90 \pm 1,45 (10) | 32,99 \pm 1,95 (10) | 30,03 \pm 1,35 (10) |
| | 72 horas | 28,99 \pm 1,78 (10) | 32,77 \pm 1,63 (9) | 29,99 \pm 1,42 (10) | 28,12 \pm 1,65 (10) |
| | 144 horas | 31,46 \pm 1,32 (10) | 32,74 \pm 2,55 (10) | 26,02 \pm 1,33 (10) | 21,48 \pm 2,12 (10) |
| PFK | 2 horas | 45,44 \pm 4,54 (10) | 42,34 \pm 3,36 (10) | 40,40 \pm 2,59 (9) | 39,22 \pm 2,17 (10) |
| | 6 horas | 59,87 \pm 2,93 (9) | 53,52 \pm 3,54 (10) | 49,10 \pm 3,54 (8) | 39,15 \pm 4,20 (9) |
| | 12 horas | 82,17 \pm 5,00 (8) | 71,26 \pm 5,72 (10) | 60,50 \pm 2,02 (9) | 58,47 \pm 2,58 (8) |
| | 24 horas | 20,96 \pm 3,27 (10) | 21,41 \pm 3,31 (10) | 37,06 \pm 3,54 (9) | 37,28 \pm 2,06 (10) |
| | 72 horas | 34,55 \pm 3,05 (9) | 44,11 \pm 2,29 (10) | 48,49 \pm 5,23 (9) | 33,29 \pm 2,96 (10) |
| | 144 horas | 24,85 \pm 2,27 (10) | 27,30 \pm 3,03 (10) | 41,10 \pm 4,37 (10) | 39,13 \pm 3,39 (10) |
| CS | 2 horas | 0,37 \pm 0,03 (9) | 0,38 \pm 0,03 (10) | 0,47 \pm 0,02 (9) | 0,48 \pm 0,06 (9) |
| | 6 horas | 0,30 \pm 0,02 (9) | 0,34 \pm 0,04 (10) | 0,47 \pm 0,02 (8) | 0,57 \pm 0,02 (9) |
| | 12 horas | 0,37 \pm 0,04 (8) | 0,36 \pm 0,02 (10) | 0,56 \pm 0,04 (9) | 0,59 \pm 0,05 (8) |
| | 24 horas | 0,29 \pm 0,01 (10) | 0,24 \pm 0,02 (10) | 0,50 \pm 0,03 (10) | 0,57 \pm 0,10 (10) |
| | 72 horas | 0,20 \pm 0,01 (10) | 0,16 \pm 0,01 (10) | 0,51 \pm 0,04 (10) | 0,48 \pm 0,02 (10) |
| | 144 horas | 0,15 \pm 0,01 (10) | 0,19 \pm 0,01 (10) | 0,47 \pm 0,02 (10) | 0,55 \pm 0,04 (10) |
| MDH | 2 horas | 5,68 \pm 0,45 (9) | 5,88 \pm 0,54 (10) | 8,18 \pm 0,30 (9) | 8,21 \pm 0,26 (10) |
| | 6 horas | 6,77 \pm 0,35 (9) | 6,61 \pm 0,37 (10) | 8,62 \pm 0,32 (8) | 9,30 \pm 0,50 (9) |
| | 12 horas | 7,78 \pm 0,99 (8) | 7,73 \pm 0,80 (10) | 9,42 \pm 0,51 (9) | 9,08 \pm 0,64 (8) |
| | 24 horas | 6,70 \pm 0,48 (10) | 5,03 \pm 0,74 (10) | 8,28 \pm 0,44 (10) | 7,15 \pm 0,15 (10) |
| | 72 horas | 5,66 \pm 0,69 (9) | 7,06 \pm 0,45 (10) | 8,42 \pm 0,35 (10) | 7,07 \pm 0,18 (10) |
| | 144 horas | 4,55 \pm 0,65 (10) | 4,26 \pm 0,95 (10) | 6,99 \pm 0,24 (10) | 7,33 \pm 0,33 (10) |
| LDH | 2 horas | 2,13 \pm 0,12 (8) | 1,25 \pm 0,21 (10) | 2,62 \pm 0,19 (9) | 2,80 \pm 0,24 (10) |
| | 6 horas | 1,81 \pm 0,28 (10) | 1,36 \pm 0,13 (10) | 2,99 \pm 0,24 (8) | 3,39 \pm 0,27 (9) |
| | 12 horas | 2,25 \pm 0,32 (7) | 2,15 \pm 0,22 (10) | 2,81 \pm 0,22 (9) | 2,61 \pm 0,29 (8) |
| | 24 horas | 1,25 \pm 0,18 (10) | 0,86 \pm 0,10 (10) | 3,22 \pm 0,39 (10) | 2,70 \pm 0,21 (10) |
| | 72 horas | 1,28 \pm 0,18 (10) | 1,59 \pm 0,19 (10) | 2,83 \pm 0,23 (10) | 2,56 \pm 0,15 (10) |
| | 144 horas | 1,12 \pm 0,15 (10) | 1,15 \pm 0,11 (10) | 2,20 \pm 0,20 (10) | 2,66 \pm 0,22 (10) |
| G-6-PDH | 2 horas | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (9) | 0,09 \pm 0,01 (9) | 0,09 \pm 0,01 (10) |
| | 6 horas | 0,04 \pm 0,00 (9) | 0,05 \pm 0,00 (10) | 0,06 \pm 0,01 (8) | 0,09 \pm 0,02 (9) |
| | 12 horas | 0,05 \pm 0,00 (8) | 0,05 \pm 0,00 (10) | 0,05 \pm 0,00 (9) | 0,05 \pm 0,01 (6) |
| | 24 horas | 0,03 \pm 0,00 (10) | 0,03 \pm 0,00 (10) | 0,05 \pm 0,00 (9) | 0,05 \pm 0,00 (10) |
| | 72 horas | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,05 \pm 0,00 (10) | 0,05 \pm 0,00 (10) |
| | 144 horas | 0,03 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) |
| G-6-Pase | 2 horas | 0,52 \pm 0,08 (10) | 0,31 \pm 0,03 (8) | 0,75 \pm 0,07 (9) | 0,32 \pm 0,08 (9) |
| | 6 horas | 0,48 \pm 0,10 (9) | 0,27 \pm 0,05 (9) | 0,94 \pm 0,09 (8) | 0,82 \pm 0,08 (8) |
| | 12 horas | 0,50 \pm 0,06 (8) | 0,34 \pm 0,05 (7) | 0,51 \pm 0,07 (9) | 0,36 \pm 0,05 (8) |
| | 24 horas | 0,35 \pm 0,03 (10) | 0,25 \pm 0,09 (6) | 1,36 \pm 0,22 (10) | 0,74 \pm 0,14 (10) |
| | 72 horas | 0,28 \pm 0,05 (10) | 0,21 \pm 0,05 (8) | 1,01 \pm 0,18 (8) | 0,40 \pm 0,07 (8) |
| | 144 horas | 0,57 \pm 0,05 (10) | 0,25 \pm 0,04 (7) | 0,58 \pm 0,09 (10) | 0,42 \pm 0,05 (10) |
| GP | 2 horas | 21,39 \pm 2,20 (10) | 24,17 \pm 2,77 (10) | 5,22 \pm 0,73 (9) | 11,27 \pm 1,04 (10) |
| | 6 horas | 12,23 \pm 0,81 (9) | 11,56 \pm 1,04 (10) | 6,03 \pm 1,37 (8) | 2,94 \pm 0,32 (9) |
| | 12 horas | 14,70 \pm 1,45 (8) | 11,72 \pm 0,61 (10) | 3,47 \pm 0,36 (9) | 5,53 \pm 0,83 (8) |
| | 24 horas | 11,49 \pm 1,83 (10) | 11,27 \pm 0,34 (10) | 10,09 \pm 0,74 (10) | 12,74 \pm 0,95 (10) |
| | 72 horas | 14,44 \pm 0,98 (10) | 15,74 \pm 0,46 (10) | 10,41 \pm 0,92 (10) | 10,30 \pm 0,81 (10) |
| | 144 horas | 11,17 \pm 1,07 (10) | 11,06 \pm 0,46 (8) | 8,56 \pm 0,85 (10) | 8,65 \pm 0,87 (10) |

4.2. Enzimas do sistema antioxidante

Em *N. rossii* (Figura 29A) o aquecimento a 8°C alterou a atividade da GST negativamente em relação a temperatura controle, nos tempos de exposição de 2 e 12 horas. Ao longo do tempo, em 0°C houve aumento dos níveis em 2 horas quando comparado com 6, 24, 72 e 144 horas e diminuição em 24 horas quando comparado com 12, 72 e 144 horas. Já em 8°C, houve diminuição da

atividade da GST em 24 horas em relação a 2, 72 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 29B), o aquecimento em 8°C alterou positivamente a atividade da GST em 6 horas. Em contrapartida, ao longo do tempo em 8°C houve alteração positiva da GST nas 12 horas iniciais, em relação aos tempos seguintes. Em 0°C observou-se modulação negativa a partir de 24 horas, quando comparada com os três primeiros tempos de exposição.

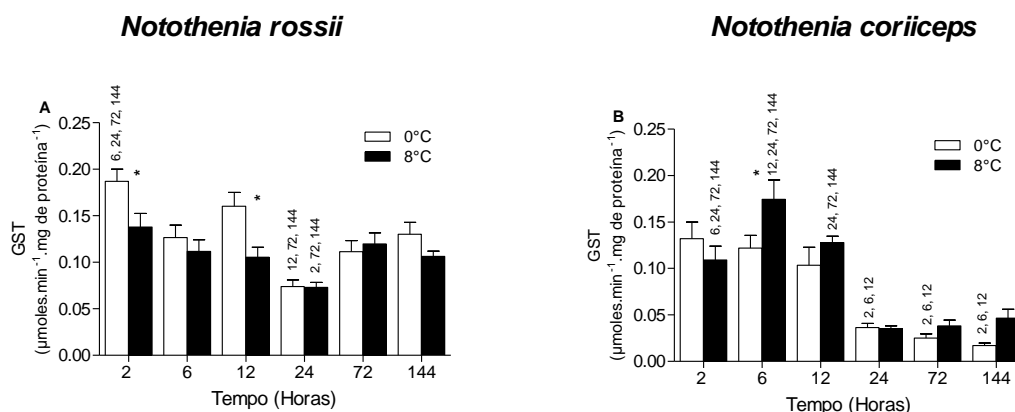


Figura 29: Níveis encefálicos de atividade da glutathiona-S-transferase (GST). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

Os níveis de atividade da GPx, em *N. rossii* (Figura 30A), foram alterados negativamente em 6 e 12 horas e positivamente em 72 e 144 horas pelo aquecimento em 8°C em relação ao grupo controle (0°C). Ao longo do tempo, os níveis foram alterados negativamente em 0°C, em 24 horas quando comparado com os demais tempos e positivamente em 6 horas em relação a 72 e 144 horas. Em 8°C houve aumento da atividade da GPx em 2 horas quando comparado com 6, 12 e 24 horas e uma diminuição em 12 horas em relação a 72 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 30B) o aquecimento a 8°C alterou positivamente os níveis de atividade da GPx em 12 horas em relação a 0°C. Ao longo do tempo, em 8°C, 12 horas, houve alteração positiva em relação aos demais tempos. Em 0°C observou-se redução em 24 horas quando comparada com 2, 6 e 72 horas.

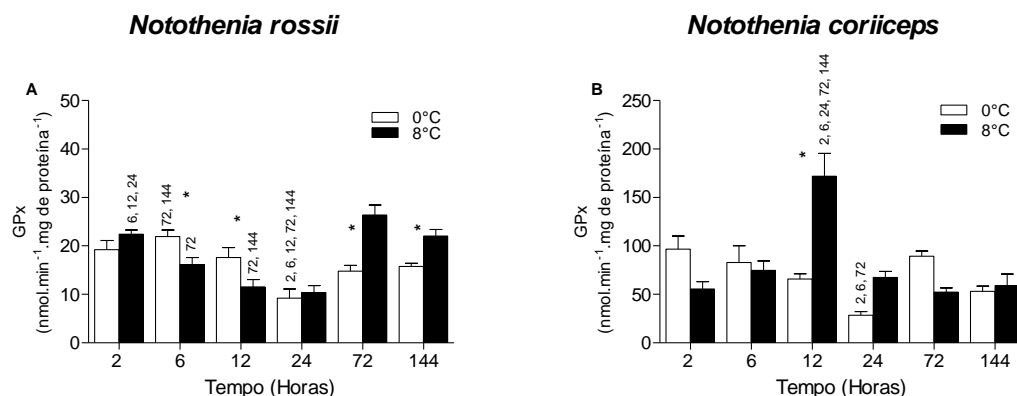


Figura 30: Níveis encefálicos de atividade da glutatona peroxidase (GPx). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

Em *N. rossii* (Figura 31A), houve alteração negativa dos níveis de atividade da GR em peixes mantidos por 2 horas em 8°C em relação ao grupo controle. Ao longo do tempo, ambas as temperaturas tiveram alterações negativas em 6 horas em relação aos demais tempos de exposição. Em 0°C, 12 horas, observou-se aumento da atividade da GR quando comparado com 24, 72 e 144 horas e diminuição em relação a 2 horas. Em 8°C, 12 horas, ocorreu alteração positiva quando comparadas com 24, 72 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 31B), não houve alterações da atividade da GR decorrentes do aumento da temperatura. Porém, ao longo do tempo, em 2 horas houve alteração positiva de ambas as temperaturas em relação aos demais tempos e em 144 horas alteração negativa de 0 e 8°C quando comparadas com 6, 12, 24 e 72 horas.

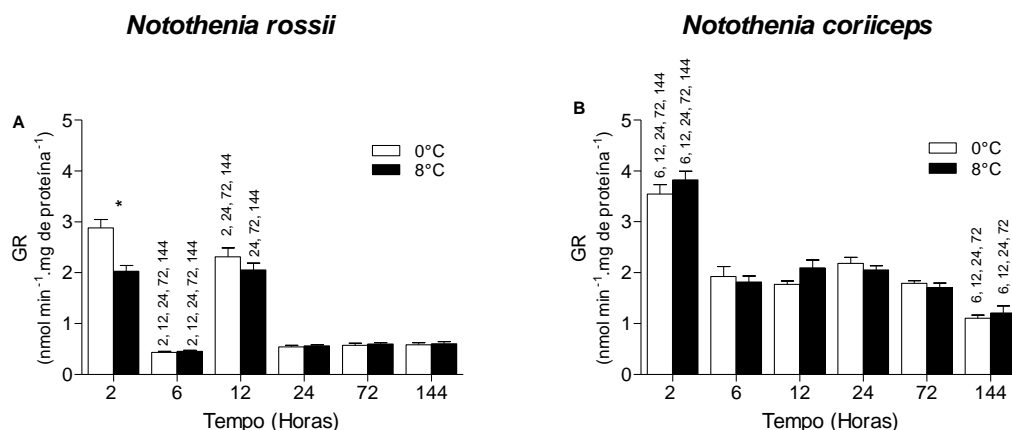


Figura 31: Níveis encefálicos de atividade da glutatona redutase (GR). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Os níveis de atividade da CAT em *N. rossii* (Figura 32A), não foram alterados pelo aquecimento em 8°C em relação ao grupo controle (0°C), porém ao longo do tempo observou-se uma alteração positiva na temperatura experimental de 8°C em 144 horas quando comparada com 6 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 32B) houve modulação positiva da CAT, em 8°C, 12 e 144 horas, em relação à temperatura controle de 0°C. Ao longo do tempo, houve em 12 e 144 horas alteração positiva em relação a 2, 6, 24 e 72 horas na temperatura de 8°C.

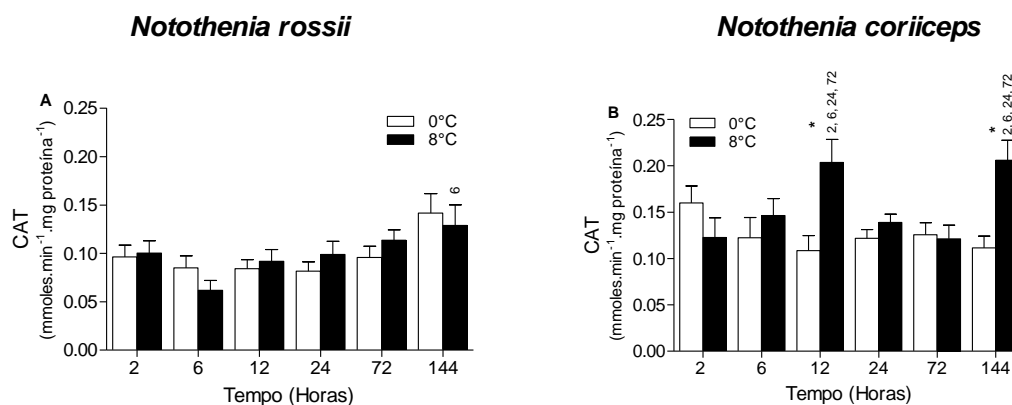


Figura 32: Níveis encefálicos de atividade da catalase (CAT). Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades da CAT expressas em $\text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Os níveis de atividade da SOD em ambas as espécies não foram alterados pelo aquecimento (Figuras 33A e 33B). Ao longo do tempo, em *N. rossii* (Figura 33A), houve alteração positiva em 0 e 8°C nos tempos de 12, 24 e 72 horas em relação a 2 e 6 horas e negativa nas mesmas temperaturas nos tempos de 144 horas quando comparadas com 12, 24 e 72 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 33B), ao longo do tempo, ocorreu alteração positiva da SOD em 0°C em 24 horas, quando comparada com os outros tempos e em 72 horas em relação a 2, 6 e 12 horas. Na temperatura de 8°C ocorreu aumento da SOD em 24 horas em relação a 2, 6, 12 e 72 horas. Observamos também alteração positiva em 72 horas em relação a 2, 6 e 12 horas e negativa quando comparada a 24 horas. Ainda encontramos no tempo de 144 horas aumento da SOD em relação a 2, 6 e 12 horas e diminuição em relação a 24 e 72 horas. Na temperatura de 0°C ao longo do tempo houve aumento nos níveis de SOD em 24 horas em relação aos outros tempos de exposição. Foi observada também alteração positiva da SOD, a 0°C, em 72 horas quando comparado com 2, 6 e 12 e negativa em relação ao tempo de 24 horas.

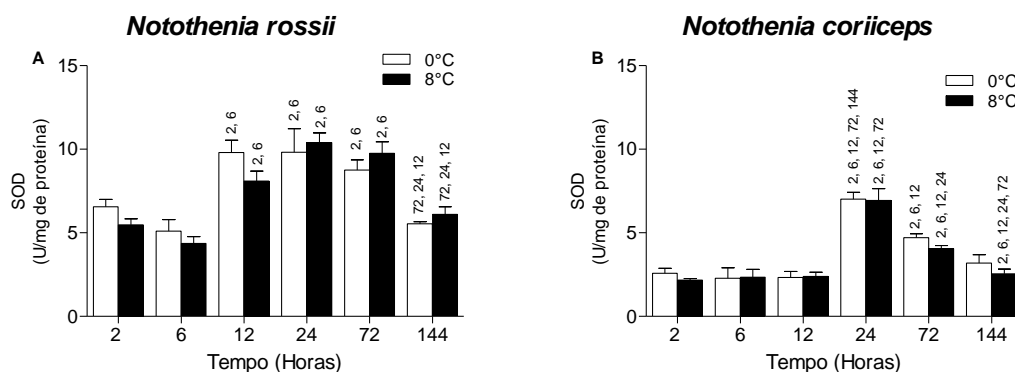


Figura 33: Níveis encefálicos de atividade da superóxido dismutase (SOD). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades da CAT expressas em U.mg proteína⁻¹.

Informações adicionais sobre os resultados do Teste de ANOVA das enzimas antioxidantes estão presentes na tabela 3 e os valores médios \pm erro padrão na tabela 4.

Tabela 3: Resultados do teste de ANOVA (duas-vias), para marcadores de estresse oxidativo, GST (glutathiona-S-transferase), GPx (glutathiona peroxidase), GR (glutathiona redutase), SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). Fatores: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas) para enzimas encefálicas de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. *Indica diferenças significativas.

| <i>Notothenia rossii</i> | | | | <i>Notothenia coriiceps</i> | | | |
|--------------------------|---|-------------|--------|-----------------------------|-------------|--------|---------|
| | | Temperatura | Tempo | TE x Ti | Temperatura | Tempo | TE x Ti |
| GST | F | 11,64 | 13,04 | 2,44 | 5,60 | 41,30 | 2,43 |
| | p | <0,01* | <0,01* | 0,04* | 0,02* | <0,01* | 0,03* |
| GPx | F | 5,59 | 18,30 | 10,24 | 4,13 | 10,76 | 13,10 |
| | p | 0,02* | <0,01* | <0,01* | 0,04* | <0,01* | <0,01* |
| GR | F | 11,67 | 225,25 | 8,46 | 0,77 | 93,25 | 1,27 |
| | p | <0,01* | <0,01* | <0,01* | 0,38 | <0,01* | 0,28 |
| CAT | F | 0,05 | 4,78 | 0,74 | 10,11 | 1,44 | 4,72 |
| | p | 0,81 | <0,01* | 0,59 | <0,01* | 0,22 | <0,01* |
| SOD | F | 0,35 | 22,65 | 1,34 | 1,46 | 41,82 | 0,37 |
| | p | 0,56 | <0,01* | 0,25 | 0,23 | <0,01* | 0,86 |

Tabela 4: Valores médio \pm erro-padrão e número de indivíduos, entre parênteses, por temperatura e espécie para cada uma das enzimas avaliadas. As atividades das enzimas GST (glutathiona-S-transferase), (superóxido dismutase) são expressas em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ para a CAT (catalase) e GPx (glutathiona peroxidase), SOD e em $\text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ para a GR (glutathiona redutase).

| <i>Notothenia rossii</i> | | | <i>Notothenia coriiceps</i> | | |
|--------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 0°C | 8°C | 0°C | 8°C |
| GST | 2 horas | 0,19 \pm 0,01 (10) | 0,14 \pm 0,01 (10) | 0,13 \pm 0,02 (9) | 0,11 \pm 0,02 (10) |
| | 6 horas | 0,13 \pm 0,01 (9) | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,12 \pm 0,01 (8) | 0,17 \pm 0,02 (8) |
| | 12 horas | 0,16 \pm 0,01 (8) | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,10 \pm 0,02 (9) | 0,13 \pm 0,02 (8) |
| | 24 horas | 0,07 \pm 0,01 (10) | 0,07 \pm 0,01 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,00 (10) |
| | 72 horas | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,12 \pm 0,01 (10) | 0,03 \pm 0,00 (10) | 0,04 \pm 0,01 (10) |
| | 144 horas | 0,13 \pm 0,01 (10) | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,02 \pm 0,00 (10) | 0,05 \pm 0,01 (10) |
| GR | 2 horas | 2,88 \pm 0,16 (10) | 2,03 \pm 0,11 (10) | 3,55 \pm 0,18 (9) | 3,83 \pm 0,17 (10) |
| | 6 horas | 0,43 \pm 0,02 (9) | 0,45 \pm 0,02 (10) | 1,92 \pm 0,20 (8) | 1,81 \pm 0,12 (9) |
| | 12 horas | 2,31 \pm 0,18 (8) | 2,06 \pm 0,13 (10) | 1,77 \pm 0,07 (9) | 2,09 \pm 0,16 (8) |
| | 24 horas | 0,54 \pm 0,03 (10) | 0,56 \pm 0,02 (10) | 2,19 \pm 0,12 (10) | 2,05 \pm 0,08 (10) |
| | 72 horas | 0,57 \pm 0,04 (10) | 0,60 \pm 0,03 (10) | 1,79 \pm 0,05 (10) | 1,71 \pm 0,09 (10) |
| | 144 horas | 0,58 \pm 0,05 (10) | 0,60 \pm 0,04 (10) | 1,10 \pm 0,07 (10) | 1,20 \pm 0,14 (10) |
| GPx | 2 horas | 19,24 \pm 1,86 (10) | 22,43 \pm 0,90 (10) | 96,81 \pm 13,43 (9) | 55,54 \pm 7,48 (9) |
| | 6 horas | 21,93 \pm 1,33 (9) | 16,13 \pm 1,45 (10) | 82,72 \pm 17,33 (7) | 74,83 \pm 9,55 (9) |
| | 12 horas | 17,61 \pm 2,07 (8) | 11,54 \pm 1,53 (9) | 65,95 \pm 5,17 (8) | 171,7 \pm 23,53 (6) |
| | 24 horas | 8,03 \pm 2,00 (8) | 10,34 \pm 1,47 (10) | 28,42 \pm 4,07 (7) | 67,41 \pm 6,31 (10) |
| | 72 horas | 14,77 \pm 1,21 (10) | 26,40 \pm 2,04 (10) | 89,45 \pm 5,25 (10) | 52,44 \pm 4,43 (10) |
| | 144 horas | 15,80 \pm 0,69 (10) | 22,02 \pm 1,39 (10) | 53,25 \pm 5,29 (10) | 59,10 \pm 11,77 (10) |
| CAT | 2 horas | 0,10 \pm 0,01 (10) | 0,10 \pm 0,01 (10) | 0,16 \pm 0,02 (7) | 0,12 \pm 0,02 (10) |
| | 6 horas | 0,08 \pm 0,01 (9) | 0,06 \pm 0,01 (10) | 0,12 \pm 0,02 (8) | 0,15 \pm 0,02 (9) |
| | 12 horas | 0,08 \pm 0,01 (8) | 0,09 \pm 0,01 (10) | 0,11 \pm 0,02 (7) | 0,20 \pm 0,03 (6) |
| | 24 horas | 0,08 \pm 0,01 (10) | 0,10 \pm 0,01 (9) | 0,12 \pm 0,01 (10) | 0,14 \pm 0,01 (10) |
| | 72 horas | 0,10 \pm 0,01 (10) | 0,11 \pm 0,01 (9) | 0,13 \pm 0,01 (10) | 0,12 \pm 0,01 (10) |
| | 144 horas | 0,14 \pm 0,02 (10) | 0,13 \pm 0,02 (9) | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,21 \pm 0,02 (10) |
| SOD | 2 horas | 6,55 \pm 0,44 (10) | 5,47 \pm 0,36 (10) | 2,56 \pm 0,30 (9) | 2,16 \pm 0,09 (10) |
| | 6 horas | 5,09 \pm 0,69 (9) | 4,35 \pm 0,41 (10) | 2,28 \pm 0,62 (8) | 2,34 \pm 0,46 (9) |
| | 12 horas | 9,79 \pm 0,75 (8) | 8,09 \pm 0,59 (10) | 2,32 \pm 0,37 (9) | 2,39 \pm 0,25 (8) |
| | 24 horas | 9,81 \pm 1,41 (10) | 10,40 \pm 0,58 (10) | 7,02 \pm 0,40 (8) | 6,93 \pm 0,70 (8) |
| | 72 horas | 8,76 \pm 0,60 (10) | 9,76 \pm 0,68 (10) | 4,71 \pm 0,23 (10) | 4,05 \pm 0,18 (10) |
| | 144 horas | 5,53 \pm 0,15 (10) | 6,11 \pm 0,45 (10) | 3,18 \pm 0,52 (10) | 2,54 \pm 0,29 (10) |

4.3. Concentração de tióis não proteicos e níveis de lipoperoxidação

A concentração de tióis não proteicos não sofreu alteração, em *N. rossii* (Figura 34A), pelo aquecimento e nem ao longo do tempo. Em *N. coriiceps* (Figura 34B) também não ocorreu alterações estatisticamente significativas causadas pelo efeito da temperatura. Houve, porém, diferenças ao longo do tempo em 8°C em 6, 2 e 12 horas sendo maiores (nesta respectiva ordem) que nos últimos três tempos. Em 0°C houve aumento em 2 e 6 horas quando comparadas com os demais tempos de exposição (exceto 24 horas).

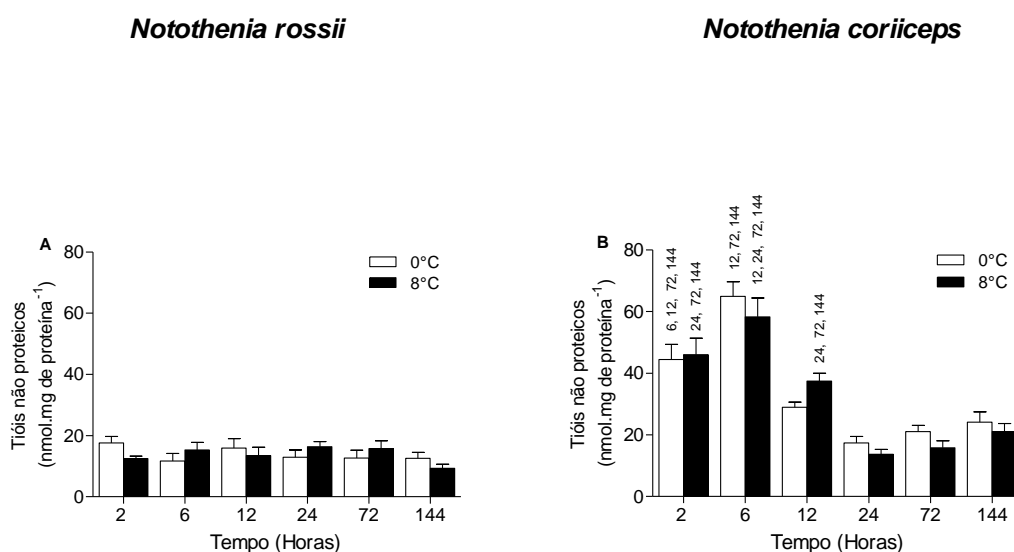


Figura 34: Concentração encefálica de tióis não proteicos. Encéfalo de *Notothenia rossii* (A) e *Notothenia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em nmol.mg de proteína⁻¹.

Os níveis de MDA não sofreram alterações em ambas as espécies pelo efeito da temperatura (Figura 35 A e B). Ao longo do tempo, em 8°C, em *N. rossii* (Figura 35A), houve aumento dos níveis de MDA em 72 horas em relação a 12 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 35B) houve alteração negativa em 0 e 8°C, em 24 horas quando comparado com 12 horas

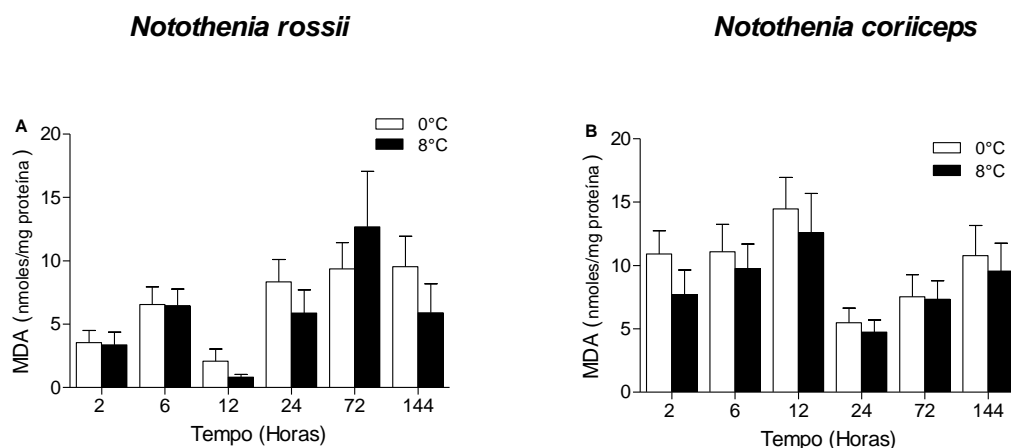


Figura 35: Níveis encefálicos de malondialdeído (MDA). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em nmol.mg de proteína⁻¹.

Informações adicionais sobre os resultados do Teste de ANOVA da concentração de tióis não proteicos e nível de malondialdeído estão presentes na tabela 5 e os valores médios \pm erro padrão na tabela 6.

Tabela 5: Resultados do teste de ANOVA (duas-vias) para tióis não proteicos e MDA (malondialdeído). Fatores: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas) para as moléculas encefálicas de *Notothernia rossii* e *Notothernia coriiceps*. *Indica diferenças significativas.

| <i>Notothernia rossii</i> | | | | <i>Notothernia coriiceps</i> | | | |
|---------------------------|-------------|-------|---------|------------------------------|-------|---------|------|
| | Temperatura | Tempo | TE x Ti | Temperatura | Tempo | TE x Ti | |
| TIÓIS NÃO PROTEICOS | F | 0,01 | 0,85 | 1,58 | 0,49 | 48,42 | 1,10 |
| | p | 0,90 | 0,52 | 0,17 | 0,48 | <0,01* | 0,36 |
| MDA | F | 0,25 | 5,29 | 0,72 | 1,56 | 4,15 | 0,14 |
| | p | 0,62 | <0,01* | 0,61 | 0,21 | <0,01* | 0,98 |

Tabela 6: Valores médio \pm erro-padrão e número de indivíduos, entre parênteses, por temperatura e espécie para cada uma das moléculas avaliadas. Valores de tióis não proteicos e MDA (malondialdeído) são expressos em nmoles. mg de proteína⁻¹.

| <i>Notothernia rossii</i> | | | <i>Notothernia coriiceps</i> | | |
|---------------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0°C | 8°C | 0°C | 8°C | |
| TIÓIS NÃO PROTEICOS | 2 horas | 17,66 \pm 2,13 (9) | 12,53 \pm 0,78 (10) | 44,47 \pm 4,91 (9) | 46,01 \pm 5,35 (10) |
| | 6 horas | 11,69 \pm 2,47 (9) | 15,31 \pm 2,46 (10) | 64,97 \pm 4,75 (8) | 58,28 \pm 6,19 (9) |
| | 12 horas | 15,96 \pm 3,08 (8) | 13,48 \pm 2,75 (10) | 28,94 \pm 1,72 (8) | 37,40 \pm 2,64 (8) |
| | 24 horas | 12,94 \pm 2,39 (10) | 16,36 \pm 1,72 (10) | 17,40 \pm 2,01 (10) | 13,70 \pm 1,63 (10) |
| | 72 horas | 12,67 \pm 2,59 (10) | 15,80 \pm 2,50 (10) | 21,06 \pm 1,96 (10) | 15,76 \pm 2,30 (9) |
| | 144 horas | 12,54 \pm 1,94 (10) | 9,29 \pm 1,36 (9) | 24,10 \pm 3,30 (10) | 21,03 \pm 2,60 (10) |
| MDA | 2 horas | 3,54 \pm 0,97 (8) | 3,38 \pm 0,99 (10) | 10,93 \pm 1,83 (9) | 7,71 \pm 1,93 (10) |
| | 6 horas | 6,56 \pm 1,39 (9) | 6,47 \pm 1,32 (9) | 11,09 \pm 2,17 (8) | 9,76 \pm 1,94 (9) |
| | 12 horas | 2,08 \pm 0,97 (8) | 0,83 \pm 0,21 (9) | 14,48 \pm 2,48 (9) | 12,59 \pm 3,09 (8) |
| | 24 horas | 8,34 \pm 1,76 (10) | 5,87 \pm 1,84 (10) | 5,47 \pm 1,18 (10) | 4,74 \pm 0,96 (10) |
| | 72 horas | 9,37 \pm 2,07 (10) | 12,69 \pm 4,37 (9) | 7,53 \pm 1,74 (10) | 7,34 \pm 1,45 (10) |
| | 144 horas | 9,54 \pm 2,40 (10) | 5,91 \pm 2,28 (10) | 10,77 \pm 2,39 (10) | 9,58 \pm 2,19 (10) |

4.4. Acetilcolinesterase

A atividade da AChE em *N. rossii* (Figura 36A) não sofreu alteração pelo efeito do aquecimento a 8°C. Ao longo do tempo constatou-se uma diminuição em 0°C, nos tempos de 2 e 12 horas quando comparados com 72 e 144 horas e em 6 horas quando comparados com 24, 72 e 144 horas. Em 8°C observou-se alteração negativa em 2 horas quando comparado com 72 e 144 horas e em 6 horas quando comparado com todos os tempos experimentais, com exceção de 2 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 36B) o aquecimento a 8°C alterou positivamente em 6 e 12 horas a atividade da AChE. Ao longo dos tempos de exposição a temperatura de 0°C alterou negativamente em 24, 72 e 144 horas quando comparados com os demais tempos de exposição. A temperatura de 8°C se mostrou maior em 6 horas quando comparado com 24, 72 e 144 horas e em 12 horas em relação a 2, 24, 72 e 144 horas.

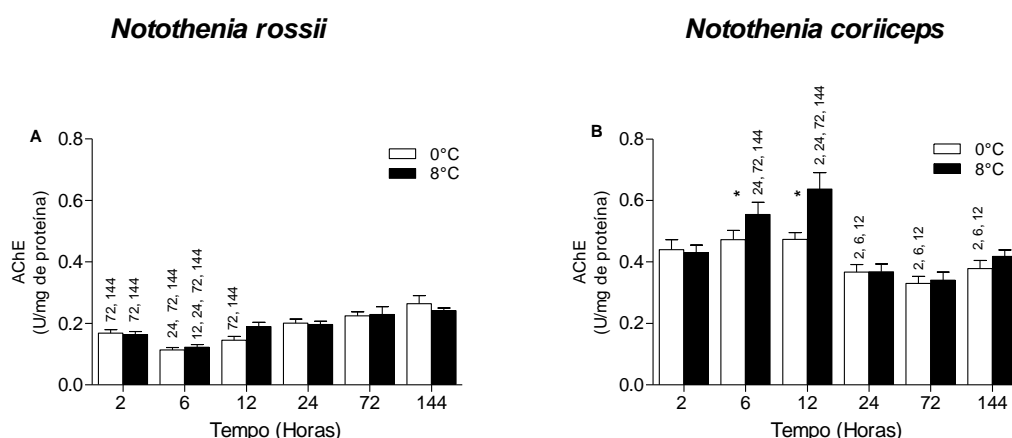


Figura 36: Níveis encefálicos de atividade da acetilcolinesterase (AChE). Encéfalo de *Notothernia rossii* (A) e *Notothernia coriiceps* (B), expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (0°C e 8°C). E os números acima das barras indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C (teste de Tukey, $p < 0,05$). Atividades expressas em U/mg de proteína.

Informações adicionais sobre os resultados do Teste de ANOVA da atividade da AChE estão presentes na tabela 7 e os valores médios \pm erro padrão na tabela 8.

Tabela 7: Resultados do teste de ANOVA (duas-vias) para acetilcolinesterase (AChE). Fatores: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas) para a enzima encefálica de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. *Indica diferenças significativas.

| <i>Notothenia rossii</i> | | | | <i>Notothenia coriiceps</i> | | | |
|--------------------------|-------------|-------|---------|-----------------------------|--------|---------|-------|
| | Temperatura | Tempo | TE x Ti | Temperatura | Tempo | TE x Ti | |
| AChE | F | 0,28 | 22,02 | 1,17 | 7,99 | 16,47 | 2,37 |
| | p | 0,60 | <0,01* | 0,33 | <0,01* | <0,01* | 0,04* |

Tabela 8: Valores médio \pm erro-padrão e número de indivíduos, entre parênteses, por temperatura e espécie para a enzima avaliada. A atividade da AChE (acetilcolinesterase) foi expressa em μ moles. mg de proteína⁻¹.

| <i>Notothenia rossii</i> | | | <i>Notothenia coriiceps</i> | | |
|--------------------------|-----------|----------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| | 0°C | 8°C | 0°C | 8°C | |
| AChE | 2 horas | 0,17 \pm 0,01 (9) | 0,16 \pm 0,01 (10) | 0,44 \pm 0,03 (9) | 0,43 \pm 0,03 (10) |
| | 6 horas | 0,11 \pm 0,01 (9) | 0,12 \pm 0,01 (10) | 0,47 \pm 0,03 (8) | 0,55 \pm 0,04 (9) |
| | 12 horas | 0,15 \pm 0,01 (8) | 0,19 \pm 0,01 (10) | 0,47 \pm 0,02 (9) | 0,64 \pm 0,05 (8) |
| | 24 horas | 0,20 \pm 0,01 (10) | 0,20 \pm 0,01 (10) | 0,37 \pm 0,02 (10) | 0,37 \pm 0,03 (10) |
| | 72 horas | 0,22 \pm 0,01 (9) | 0,23 \pm 0,02 (10) | 0,33 \pm 0,02 (10) | 0,34 \pm 0,03 (10) |
| | 144 horas | 0,26 \pm 0,03 (7) | 0,24 \pm 0,01 (9) | 0,38 \pm 0,03 (10) | 0,42 \pm 0,02 (10) |

As modulações significativas dos dados do metabolismo de carboidratos, estresse oxidativo e de neurotransmissão decorrente do aquecimento mostradas no grupo experimental de 8°C quando comparadas com o grupo controle de 0°C, de *N. rossii* (Tabela 8) e *N. coriiceps* (Tabela 9) estão resumidas nas tabelas abaixo.

Tabela 8: Resumo das alterações estatisticamente significativas provenientes das análises experimentais (8°C) em relação à temperatura controle (0°C), nos tempos de 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas de *N. rossii* (NR). As setas indicam a modulação positiva (para cima) ou negativa (para baixo) e o sinal de (-) indica que não foi observado alterações nos níveis analisados.

| NR | Bioindicador/hora | 2 h | 6 h | 12 h | 24 h | 72 h | 144 h |
|-----------------------------|---------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|
| Metabolismo de carboidratos | Hexoquinase | - | - | ↓ | - | - | - |
| | Fosfofrutoquinase | - | - | - | - | - | - |
| | Citrato sintase | - | - | - | - | - | - |
| | Malato desidrogenase | - | - | - | - | - | - |
| | Lactato desidrogenase | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| | Glicose-6-fostase | - | - | - | - | - | ↓ |
| | Glicose-6-desidrogenase | - | - | - | - | - | - |
| | Glicogênio fosforilase | | | | | | |
| Estresse oxidativo | Glutathiona-S-transferase | ↓ | - | ↓ | - | - | - |
| | Glutathiona peroxidase | - | ↓ | ↓ | - | ↑ | ↑ |
| | Glutathiona redutase | ↑ | - | - | - | - | - |
| | Glutathiona | - | - | - | - | - | - |
| | Superóxido dismutase | - | - | - | - | - | - |
| | Catalase | - | - | - | - | - | - |
| | Lipoperoxidação | - | - | - | - | - | - |
| Neurotransmissão | Acetilcolinesterase | - | - | - | - | - | - |

Tabela 9: Resumo das alterações estatisticamente significativas provenientes das análises experimentais (8°C) em relação à temperatura controle (0°C), nos tempos de 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas de *N. coriiceps* (NC). As setas indicam a modulação positiva (para cima) ou negativa (para baixo) e o sinal de (-) indica que não foi observado alterações nos níveis analisados.

| NC | Bioindicador/hora | 2 h | 6 h | 12 h | 24 h | 72 h | 144 h |
|-----------------------------|---------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|
| Metabolismo de carboidratos | Hexoquinase | - | - | - | - | - | - |
| | Fosfofrutoquinase | - | - | - | - | ↓ | - |
| | Citrato sintase | - | - | - | - | - | - |
| | Malato desidrogenase | - | - | - | - | - | - |
| | Lactato desidrogenase | - | - | - | - | - | - |
| | Glicose-6-fostase | ↓ | - | - | ↓ | ↓ | - |
| | Glicose-6-desidrogenase | - | ↑ | - | - | - | - |
| | Glicogênio fosforilase | | | | | | |
| Estresse oxidativo | Glutathiona-S-transferase | - | ↑ | - | - | ↑ | - |
| | Glutathiona peroxidase | - | - | ↑ | - | - | - |
| | Glutathiona redutase | - | - | - | - | - | - |
| | Glutathiona | - | - | - | - | - | - |
| | Superóxido dismutase | - | - | - | - | - | - |
| | Catalase | - | - | ↑ | - | - | ↑ |
| | Lipoperoxidação | - | - | - | - | - | - |
| Neurotransmissão | Acetilcolinesterase | - | ↑ | ↑ | - | - | - |

5. DISCUSSÃO

O cérebro dos vertebrados, para alguns autores, é o órgão mais vulnerável a flutuações térmicas, uma vez que a maioria das respostas fisiológicas de aclimação a fatores estressores são iniciadas pelo sistema nervoso central (SNC) (TSENG *et al.*, 2011). Este controla a aclimação do metabolismo celular de forma sistêmica (BREER e RAHMANN, 1974) e, neste trabalho, importantes marcadores do metabolismo encefálico foram analisados (Figura 37).

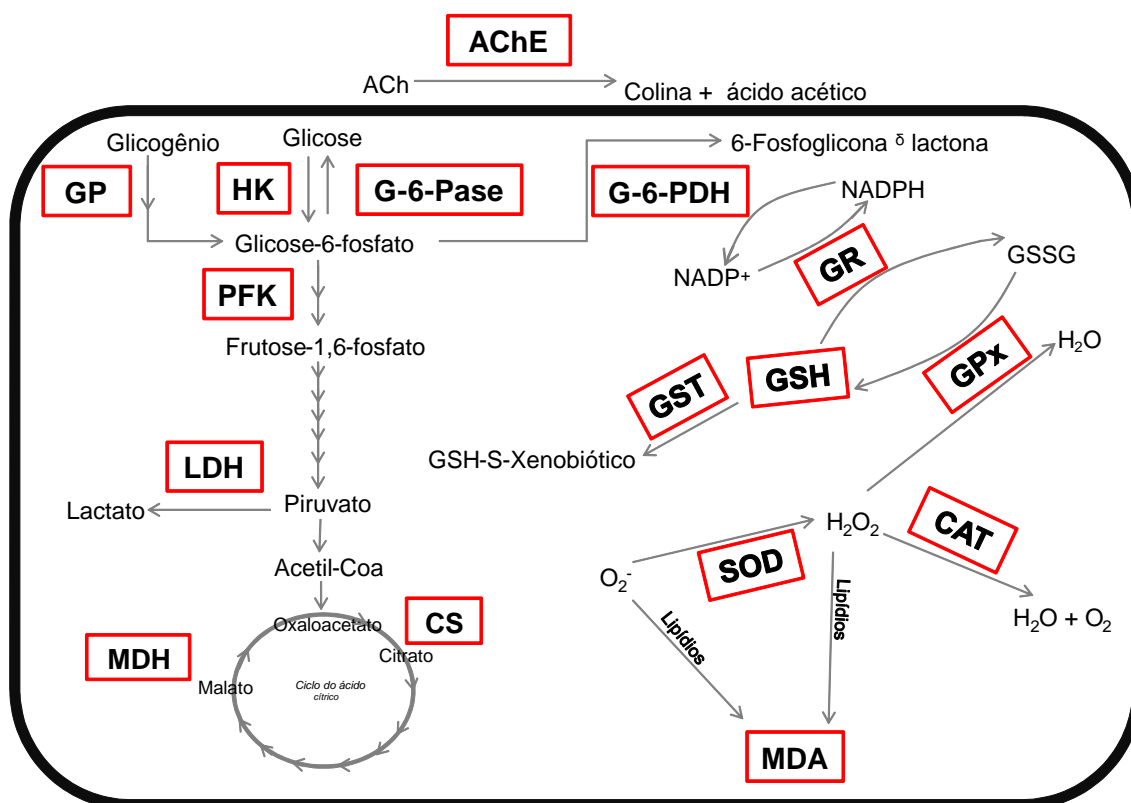


Figura 37: Representação do metabolismo encefálico com as enzimas do metabolismo de carboidratos, enzimas e marcadores do estresse oxidativo e enzima de neurotransmissão estudadas no presente trabalho. HK: hexoquinase; PFK: fosfofrutoquinase; GP: glicogênio fosforilase; G-6-Pase: glicose-6-fosfatase; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase; MDH: malato desidrogenase; G-6-PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase; GR: glutaciona redutase; GSH: glutationa; GPx: glutaciona peroxidase; GST: glutaciona-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; MDA: malondialdeído; AChE: acetilcolinesterase.

O equilíbrio entre produção e armazenamento de glicose é de extrema importância para a manutenção da homeostase do organismo. Este equilíbrio depende principalmente da regulação da atividade e da expressão de enzimas chave envolvidas nas vias da glicólise e da gliconeogênese (ENES *et al.*, 2009).

As maiores reservas de glicogênio do cérebro se encontram nos astrócitos que podem utilizar esta fonte de energia sob certas condições de estresse (GHOSH *et al.*, 2005; DIENEL e CRUZ, 2014). O encéfalo de *N. rossii* não modulou o nível de atividade da GP, enquanto que em *N. coriiceps* teve rápida alteração no metabolismo do glicogênio frente ao aumento de temperatura, indicada pelo aumento da GP em 2 horas, que pode ser justificável como um mecanismo bioquímico compensatório para manter o nível

de glicose na exposição a esse estresse inicial (DINUZZO *et al.*, 2011). O que está de acordo com Breer e Rahmann (1974) em um estudo com os peixes de água doce, *Carassius auratus* e *Scardinius erythrophthalmus*, onde observaram, em condições experimentais, que os níveis de glicogênio no cérebro diminuíram com o aumento da temperatura. A ativação da GP pode ser regulada principalmente pelo nível de energia dos astrócitos (DINUZZO *et al.*, 2011).

A via da glicogenólise, que foi ativada em 2 horas, representada pela modulação positiva da GP, gera uma fonte de glicose-6-fosfato (DIENEL e CRUZ, 2014) em *N. coriiceps*. Na célula, existem vários destinos para a glicose-6-fosfato, dentre eles, a glicólise aeróbica e/ou a fermentação, a produção de glicose livre pela G-6-Pase ou a entrada na via das pentoses fosfato (GHOSH *et al.*, 2005). Os níveis de G-6-Pase sofreram alterações negativas em ambas as espécies indicando que a glicose não foi exportada, visto possíveis necessidades das células por energia, de forma imediata em *N. coriiceps* (2, 24 e 72 horas) e tardia em *N. rossii* (144 horas). Essa redução dos níveis de atividade da G-6-Pase garante a utilização da glicose no metabolismo celular do encéfalo, já que a fosforilação desta no interior de neurônios e astrócitos é uma fase crítica para a divisão de glicose entre estas duas células (DINUZZO *et al.*, 2011).

Em *N. coriiceps* o possível aumento dos níveis de glicose-6-fosfato, oriundo das alterações encontradas na atividade da GP e G-6-Pase nos tempos iniciais de exposição ao estressor, ativa o aumento da via das pentoses fosfato que é indicado pelo aumento da atividade da G-6-PDH, a qual teve modulação positiva em 6 horas. Elevações nos níveis de atividade da G-6-PDH frente ao aumento da temperatura podem ser associadas com a capacidade biosintética ou com a elevação das defesas antioxidantes, sendo este último papel mais periférico, porém importante como descrito em Bagnyukova *et al.* (2003). Em *N. rossii* não observamos alterações nos níveis de atividade da G-6-PDH frente ao estresse térmico. Diferente dos dados encontrados em *N. coriiceps*, mas semelhante aos encontrados em *N. rossii*, no *goldfish* a atividade da G-6-PDH no cérebro não alterou com o choque térmico quente (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006b).

A PFK representa um importante ponto de controle no metabolismo de carboidratos tendo por objetivo coordenar mudanças no metabolismo de carboidratos em resposta a mudanças no estado fisiológico (LUSHCHAK *et al.*, 1998). O nível de atividade da PFK frente ao aquecimento em *N. rossii* não foi alterado enquanto que em *N. coriiceps* alterou negativamente em 72 horas. Junto a isso em *N. coriiceps*, os níveis de HK não alteraram e em *N. rossii* observamos alteração negativa em 12 horas. Os resultados encontrados de HK e PFK, para *N. coriiceps* sugerem que o destino do substrato glicose-6-fosfato pode seguir vias distintas da glicolítica (NELSON e COX, 2011). Como os níveis de G-6-Pase também reduziram, a opção de exportação da glicose fica improvável (DINUZZO *et al.*, 2011). Uma possível explicação seria um aumento nos níveis de ATP, que atuam inibindo a PFK (LOWRY e PASSONNEAU, 1966), favorecendo a síntese de glicogênio (DINUZZO *et al.*, 2011).

A modulação negativa da HK, como ocorrido em *N. rossii* em 12 horas, foi estudada por DIENEL e CRUZ, 2014 onde os autores propõem uma nova função para a glicogenólise, que além de fornecer substrato para os astrócitos, células que possuem as maiores reservas de glicogênio no encéfalo, regulam a utilização astrocitária de glicose extracelular pela inibição da HK, desviando assim a glicose sanguínea para uso dos neurônios (DIENEL e CRUZ, 2014). Além disso, estudos com cérebro de *Oncorhynchus mykiss* indicam que alterações significativas nos níveis de glicogênio podem em um período de apenas seis horas (BLANCO *et al.*, 2015).

Em nosso trabalho a atividade encefálica das enzimas CS e MDH não sofreram alterações pela temperatura em ambas as espécies, mantendo o mesmo nível de atividade para o metabolismo aeróbico. No entanto, trabalhos com outros órgãos, com peixes antárticos submetidos a estresse térmico (quente), encontraram uma redução no nível de atividade da CS nos tecidos hepático (WINDISCH *et al.*, 2011), cardíaco e muscular (JAYASUNDARA *et al.*, 2013). A ausência de modulação da MDH e CS pela temperatura pode indicar que os níveis de atividade de ambas podem estar sendo expressos em concentrações catalíticas suficientes para atender as necessidades metabólicas do encéfalo.

Em *N. rossii* observamos um decréscimo no nível de atividade da LDH nas primeiras 6 horas enquanto que em *N. coriiceps* não foi observado

modulação frente ao aumento de temperatura. A atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos, dentre elas a LDH e a CS encefálica, varia entre as espécies de peixes, se mostrando de forma global mais elevada (ensaios realizado em 10°C) em peixes antárticos quando comparada com peixes tropicais segundo Kawall e colaboradores (2002). Estes resultados podem ser devido a concentrações mais elevadas das enzimas, enzimas mais eficientes ou ainda a combinação destes dois fatores (KAWALL *et al.*, 2002). A modulação negativa da LDH encontrada em *N. rossii*, foi diferente dos resultados observados em cérebro de *zebrafish* quando submetidos a estresse térmico frio onde a quantidade de LDH aumentou indicando, neste caso, que a via anaeróbica é necessária para manter a funcionalidade do cérebro (TSENG *et al.*, 2014). Sugere-se que esta redução da LDH, em nossos resultados de *N. rossii*, pode estar relacionada com a ausência de substrato para essa via (VERMA *et al.*, 2007), e assim modula o potencial anaeróbico gerador de ATP, podendo desempenhar um papel limitante no funcionamento (JAYASUNDARA *et al.*, 2013) do encéfalo de *N. rossii* nas primeiras horas de exposição.

O cérebro consome cerca de 20% do oxigênio utilizado pelo corpo, mas constitui aproximadamente apenas 2% do peso corporal, conseqüentemente, EROs são continuamente geradas durante o metabolismo oxidativo. Portanto, o sistema antioxidante tem função essencial no cérebro (DRINGEN, 2000), mais ainda em peixes antárticos onde a concentração de oxigênio nos tecidos é maior, quando comparada com peixes de clima temperado, devido à elevada solubilidade do oxigênio em águas mais frias (ANSALDO *et al.*, 2000; ABELE e PUNTAROLO, 2004).

Existem indícios de que a relação entre a capacidade aeróbica dos peixes está relacionada com a sua tolerância térmica, visto que variações de temperatura podem alterar o balanço de oxigênio nos tecidos, promovendo a geração de EROs (ENZOR e PLACE, 2014; MACHADO *et al.*, 2014).

O presente estudo sugere a relevância da ação das enzimas antioxidantes encefálicas dependentes de glutathione, GST e GPx, e da CAT para *N. coriiceps* e das enzimas dependentes de glutathione, GST, GPx e GR, para *N. rossii* na manutenção da integridade e função celular, principalmente nas 12 primeiras horas quando submetidos a alta temperatura. Em um estudo de choque térmico frio com cérebro de *zebrafish*, onde o enfoque das análises

dos fatores antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos se deteve nas 24 primeiras horas, os autores notaram que este é o período em que as diferenças mais significativas foram encontradas nesta espécie exposta a temperatura de 18°C (WU *et al.*, 2015). A elevação de enzimas antioxidantes frente a variação térmica indica indiretamente a formação de EROs e o processo de desintoxicação do organismo (PFLUGMACHER, 2004; WU *et al.*, 2015).

Dentre as enzimas antioxidantes estudadas a GPx é considerada a principal enzima antioxidante do cérebro, pois elimina hidroperóxidos protegendo os neurônios dos danos (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995). Neste trabalho a GPx aumentou em 12 horas, em *N. coriiceps*, sugerindo que neste período há um acréscimo na produção de peróxidos, corroborado com a modulação positiva da CAT em 12 horas. Em *N. rossii*, a CAT não foi modulada pelo aumento de temperatura, já a GPx mostrou um decréscimo na capacidade de resposta em 6 e 12 horas, porém teve modulação positiva em 72 e 144 horas, indicando uma compensação fisiológica. Essa compensação na atividade pode ser controlada por alterações na tradução do mRNA da GPx de acordo com características fisiológicas e comportamentais específicas da espécie, sendo ainda tecido-específicas como descrito no coração de peixe antártico por Sattin e colaboradores (2015), onde uma maior atividade locomotora, aumenta a atividade cardíaca desencadeando um maior consumo de oxigênio, assim como a elevação nos níveis de EROs. Essa condição eleva os níveis de tradução de genes antioxidantes, como também a tradução de transcritos armazenados resultando em uma resposta fisiológica mais rápida.

Machado e colaboradores (2014) estudaram as mesmas espécies de nototenídeos antárticos submetidas a 8°C e não encontraram variação na atividade hepática das enzimas CAT e GPx em ambas as espécies. Comparando nossos dados com os dados de Machado *et al.* (2014) podemos perceber uma rápida sensibilidade de resposta no encéfalo dessas enzimas, quando comparado com o fígado sob estresse térmico. O que corrobora com o encontrado por Wu e colaboradores (2015) que relatam um maior potencial do sistema antioxidante do cérebro de *zebrafish* para responder a exposição ao estresse térmico quando comparado ao fígado e brânquias.

Em nosso estudo a SOD não foi alterada em ambas as espécies, assim como a CAT em *N. rossii*, podendo indicar que esses nototenídeos possuem o nível dessas enzimas antioxidantes suficiente para compensar os cenários de mudanças térmicas (quente e frio), assim como descrito em Bagnyukova e colaboradores (2007) e Enzor e Place (2014). Ideia reforçada também pelo fato dos níveis de dano oxidativo (MDA) não terem aumentado nas duas espécies do nosso experimento frente ao aquecimento. Diferente do encontrado por Mueller e colaboradores (2012) onde aumentou o nível de dano oxidativo no coração de *icefishes* e nototenídeos antárticos de sangue vermelho quando submetidos as respectivas CT_{max}, porém não ocorreu um aumento da atividade da SOD e CAT, indicando neste órgão, diferente do encéfalo, uma possível perda da capacidade de elevar os níveis destas enzimas antioxidantes em resposta ao estresse térmico.

Em estudo com cérebro de *goldfish* (*C. auratus*) aclimatado na temperatura de 3 e exposto a 23 °C os produtos iniciais da peroxidação lipídica (LPO) aumentaram, já os produtos finais da LPO não sofreram alterações substanciais no cérebro na exposição à temperatura mais elevada. Uma possível explicação seria uma modificação da composição de lipídios de membrana, o que causaria menores danos pela alta temperatura (BAGNYUKOVA *et al.*, 2007).

A não modulação na atividade de enzimas antioxidantes frente ao aquecimento em diferentes órgãos (encéfalo não analisado) foi observada em peixes não antárticos (GRIM *et al.*, 2010; GRIM *et al.*, 2013). Estes autores sugerem a possibilidade de antioxidantes de baixo peso molecular, como a vitamina E, desempenharem o papel necessário para reduzir a susceptibilidade à LPO e/ou proteger os peixes com uma capacidade antioxidativa mais elevada (GRIM *et al.*, 2010). Ou ainda, a função do ascorbato um antioxidante de baixo peso molecular como potencial atenuador de dano lipídico (GRIM *et al.*, 2013).

Diferente dos mamíferos, a GST em peixes não foi extensivamente caracterizada, porém a grande maioria das espécies analisadas mostraram ter atividade da GST (SHEEHAN *et al.*, 2001; TRUTE *et al.*, 2007). Neste trabalho foi observado, no encéfalo de *N. coriiceps*, modulação positiva em 6 horas em relação ao grupo controle, e em *N. rossii*, ao contrário modulação negativa em 2 e 12 horas. Os níveis de GST normalmente são relacionados com os de LPO,

visto que a GST está envolvida na desintoxicação de produtos de lipoperoxidação (MACHADO *et al.*, 2014), e em nosso trabalho não foi observada essa associação. Strobel e colaboradores (2015) revelam em estudo com peixes antárticos (incluindo *N. rossii*) e de zonas temperadas a baixa capacidade dos peixes polares de aumentar a atividade de enzimas biotransformadoras (GST) sob temperaturas mais elevadas. Assim, a plasticidade térmica limitada pode causar uma maior bioacumulação de xenobióticos em tecidos de peixes antárticos quando comparado com peixes temperados.

Os níveis de atividade da GR, não alteraram em *N. coriiceps*, mas reduziram em 2 horas em *N. rossii*. Enquanto que os níveis de atividade da glutathione não foram modulados em ambas as espécies frente ao aumento da temperatura. A não modulação da GR em resposta ao aumento da temperatura foi observada em cérebro do peixe *goldfish* (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006b) enquanto que os níveis de GSH no cérebro do peixe *killifish* aumentaram com temperaturas mais elevadas (LEGGATT *et al.*, 2007).

A AChE é uma enzima chave no metabolismo do sistema nervoso, e alterações em seus níveis podem gerar perturbações nos organismos tendo como consequência, a curto prazo, comprometimento comportamental do indivíduo e a longo prazo comprometimento populacional (HOGAN, 1970; BALDWIN *et al.*, 2009; CHUIKO *et al.*, 1997; DURIEUX *et al.*, 2011).

A atividade da AChE no encéfalo de *N. rossii* e *N. coriiceps* não pode ser comparada com outros dados, pois não existem estudos experimentais avaliando a atividade da AChE de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico na literatura. A dificuldade para comparar segue mesmo em relação aos estudos com peixes tropicais ou temperados, pois se sabe que, a variabilidade dos valores de atividade da AChE é muito diferente entre as espécies. Neste contexto, visando expandir e aprofundar o conhecimento sobre a plasticidade das respostas fisiológicas e metabólicas dos peixes antárticos os níveis de atividade AChE foram analisados, em *N. rossii* e *N. coriiceps*, frente ao estresse térmico.

A atividade da AChE no encéfalo em *N. rossii* não alterou em decorrência do aumento da temperatura. A estabilidade da AChE encontrada nesta espécie, corrobora com o estudo de Phillips *et al.* (2002) com o peixe de água

doce *Stizostedion vitreum* exposto a temperaturas que variaram de 17,2 a 24,6°C por 1h, 4 e 7 dias, onde não encontraram diferenças significativas na atividade encefálica da AChE frente ao aumento da temperatura. Do mesmo modo, Beauvais *et al.* (2001) não encontrou variação significativa na atividade na AChE em relação a temperatura proposta de 20-31°C, no seu estudo com o peixe *Lepomis macrochirus*.

Ao longo do tempo, em *N. rossii* observou-se que os níveis de AChE nas primeiras 12 horas de exposição foram reduzidos quando comparados com os outros tempos, nas duas temperaturas testadas. Isso foi verificado por Quintaneiro *et al.* (2008) no peixe estuarino *Pomatoschistus microps* que modulou a atividade da AchE cerebral, e os níveis foram mais elevados no final da aclimação do que no início, sugerindo uma adaptação fisiológica para as condições de laboratório. Esta adaptação deve ser levada em consideração no delineamento experimental, evitando erros na interpretação dos efeitos da temperatura sobre este bioindicador. Sugerindo até um aumento no tempo de aclimação às condições laboratoriais de *N. rossii* para a utilização da AChE como critério de efeito em bioensaios, situação não necessária para *N. coriiceps* visto que não apresenta o mesmo padrão de elevação nos níveis dessa enzima ao longo do tempo. Em *N. coriiceps*, observamos que a atividade da AChE em 0°C se apresenta menor após 24 horas de exposição quando comparadas com os três primeiros tempos.

Os níveis de atividade da AChE em *N. coriiceps* aumentaram com a temperatura de 8°C em 6 e 12 horas. Niemierko (1978) trabalhou com duas espécies de peixes antárticos, em condições naturais, estudando cinética enzimática, encontrando a maior atividade da AChE cerebral em *Notothenia gibberifrons* a 18°C e *Pseudochaenichthys georgianus* a 37°C. Os autores argumentam que sendo a temperatura média do habitat de ambas as espécies de aproximadamente 2°C, os resultados obtidos mostram o efeito diverso da temperatura na atividade da AChE nas espécies analisadas, possivelmente aplicável também para a diversidade de resposta entre *N. rossii* e *N. coriiceps*, observada neste trabalho.

Almeida (2015) observou no peixe marinho *Dicentrarchus labrax* L. exposto a variações de temperatura, que a atividade da AChE cerebral em animais expostos a 25°C foi de 19% maior quando comparada com 18°C.

Bocquené e colaboradores (1990) estudaram a temperatura ótima da atividade da AChE para monitoramento de poluição marinha em três espécies de peixes marinhos *Pleuronectes platessa*, *Scomber scomber* e *Solea solea*. Encontraram o resultado na escala de 20-34°C, confirmando a influência da temperatura na atividade desta enzima. Hazel (1969) não encontrou em seu estudo uma resposta compensatória da atividade da AChE na aclimação tanto para altas ou baixas temperaturas em *Fundulus heteroclitus*, porém em *Carassius auratus* foi encontrada uma relação entre a aclimação a altas temperaturas e a atividade colinesterásica cerebral. Esse estudo mostra que a aclimação térmica mostrou diferentes respostas nas duas espécies, como ocorreu com nosso experimento.

A influência da temperatura sobre a atividade da AChE mostrou neste trabalho diferentes respostas nas duas espécies analisadas, e sugere-se que a faixa térmica utilizada por *N. rossii* não foi suficiente para que ocorressem tais alterações, visto que esta espécie apresenta maior plasticidade fisiológica frente a agentes estressores (MACHADO *et al.*, 2014, RODRIGUES *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o estresse térmico de 8°C, em *N. rossii* e *N. coriiceps*, induz a diferentes ajustes metabólicos do encéfalo nos níveis e perfis ao longo do tempo nas atividades das enzimas do metabolismo de carboidratos, das defesas antioxidantes e da enzima de neurotransmissão. O metabolismo de carboidratos encefálico teve alterações em ambas às espécies frente à elevação térmica. As reservas energéticas, o glicogênio, em *N. coriiceps* mostraram ter importância na regulação da via das pentoses fosfato nas primeiras horas de exposição. O possível armazenamento de glicose, em glicogênio, pode ser proposto no terceiro dia para esta espécie. Já em *N. rossii* o metabolismo anaeróbico teve uma redução das primeiras horas de exposição, seguida de uma redução na HK, onde se sugere uma regulação energética entre neurônios e astrócitos. A faixa de temperatura utilizada nesse trabalho, para *N. rossii* não foi suficiente para provocar alterações na atividade da AChE enquanto que para *N. coriiceps* a temperatura testada provoca alterações na atividade desta enzima. O perfil ao longo do tempo em *N. rossii* sugere a necessidade de um maior tempo de aclimação quando este bioindicador estiver sendo analisado. Nas defesas antioxidantes a GPx e GST parecem ser enzimas críticas envolvida na resposta a elevação de temperatura, pois ambas as atividades modularam nas duas espécies, mostrando serem opções na avaliação de parâmetros antioxidantes no encéfalo. As enzimas CAT e GR mostraram alterações em *N. coriiceps* e em *N. rossii*, respectivamente. Sendo todas estas alterações um indicativo de padrões específicos do tecido e ao mesmo tempo exibindo a particularidade de respostas a este tipo de estresse para cada espécie, mesmo sendo espécies filogeneticamente muito próximas.

REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v.138, p. 405-415, 2004.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: Implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45-55, 2015.
- ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.468, p.130–137, 2015
- ANSALDO, M.; LUQUET, C. M.; EVELSON, P. A.; POLO, J. M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v.23, p.160-165, 2000.
- ASSIS, C. R. D.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. **INTECH Open Access Publisher**, 2011.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
- BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 C. **Journal of Thermal Biology**, 32(4), 227-234, 2007.
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of thermal biology**, v. 28, n. 1, p. 21-28, 2003.
- BALDWIN, D. H.; SPROMBERG, J. A.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. **Ecological Applications**, 19(8), 2004-2015, 2009.
- BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.342, p.213-225, 2007.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry international**, 26(5), 497-502, 1995.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BARTON, B. A.; G. K. IWAMA. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v.1, p. 3-26, 1991.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, p.1109–1115, 2004.

BASAGLIA, F. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 213-226, 1989.

BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M. e IWAMA, K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**, v.295, p.173-183, 2002.

BEAUVAIS, S. L. COLE J. K.; ATCHISON, J. G.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Test**, p. 249-264, 2001

BECKER, K.; WÖHRMANN, A. F. A.; RAHMANN, H. Brain Gangliosides and Cold-adaptation in High-Antarctic Fish. **Biochemical Systemat and Ecology**, v. 23, n. 716, p. 695-707, 1995.

BEITINGER, T. L.; BENNETT, W. A.; MCCAULEY, R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 58, n. 3, p. 237-275, 2000.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7ª Edição. New York: W. H. Freeman, 2012.

BILYK, K.T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v.158, n.4, p.382-90, 2011.

BLANCO, A. M.; GÓMEZ-BORONAT, M.; PÉREZ-MACEIRA, J.; MANCEBO, M. J.; ALDEGUNDE, M. Brain glycogen supercompensation after different conditions of induced hypoglycemia and sustained swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 187, 55-60, 2015.

BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, p.388 – 397, 2006.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, n. 2, p. 75-89, 1990.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAUER, P. R.; SANMANN, J. N.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on Na⁺/K⁺-ATPase - subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.** v.285, p.600–609, 2005.

BREER, H.; RAHMANN, H. Temperature effect on brain glycogen of fish. **Brain research**, v. 74, n. 2, p. 360-365, 1974.

CAILLEAUD, K.; MAILLET, G.; BUDZINSKI, H.; SOUISSI, S.; FORGET-LERAY, J. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v.147, n.4, p.841-9, 2007.

CAMPBELL, H. A.; FRASER, K. P. P.; BISHOP, C. M.; PECK, L. S.; EGGINTON, S. Hibernation in an Antarctic fish: On ice for winter. **Plos One**, v. 3, n. 3, 2008.

CASAUX, R.J.; A.S. MAZZOTA; E.R. BARRERA-ORO. Seasonal aspects of the biology and diet of nearshore nototheniid fish at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology** v. 11, p. 63-72. 1990.

CASAUX, R.; BARRERA-ORO, E.; BARONI, A.; RAMÓN, A. Ecology of inshore nototheniid fish from the Danco Coast, Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v.26, p.157-165. 2003

CASTRO, C.; PERÉZ-JIMÉNEZ, A.; COUTINHO, F.; DÍAZ-ROSALES, P.; DOS REIS SERRA, C. A.; PANSERAT, S.; OLIVA-TELES, A. Dietary carbohydrate and lipid sources affect differently the oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **British Journal of Nutrition**, 114(10), 1584-1593, 2015.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; LEE, Y.-C.; BABA, O.; HWANG, P.-P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **The Journal of Experimental Biology**. v. 210, p 3494-3594, 2007.

CHEN, C. J.; HSU, L. I.; WANG, C. H.; SHIH, W. L.; HSU, Y. H.; TSENG, M. P.; WANG, L. H. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. **Toxicology and applied pharmacology**, 206(2), 198-206, 2005.

CHEN, L.; DEVRIES, A. L. E.; CHENG, C. C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Evolution**. v. 94, p. 3817–3822, 1997.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**. v.52, n.3, p.273-283, 1979.

CHUIKO, G. M.; ZHELNIN, Y.; POD'GORNAYA, V. A. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): a freshwater fish from northwest Russia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 117, n. 3, p. 251-257, 1997.

CLARKE, A.; JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of antarctic fishes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 5, p. 212-218; 1996.

CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M.; MURPHY, E. J.; ROGERS, A. D. Introduction. Antarctic ecology from genes to ecosystems: the impact of climate change and the importance of scale. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 362(1477), 5–9. 2007.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, 11(3), 315-335, 2013.

COPPES, Z. Lactate dehydrogenase in teleosts. The role of LDH-C 4 isozyme. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 673-677, 1992.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

DAS, T.; PAL, A. K.; CHAKRABORTY, S. K.; MANUSH, S. M.; SAHU, N. P.; MUKHERJEE, S.C. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. **Journal of Thermal Biology** v.30, p.378–383, 2005.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F. Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 1, p. 281-298, 2014.

DINUZZO, M.; MARAVIGLIA, B.; GIOVE, F. Why does the brain (not) have glycogen?. **Bioessays**, v. 33, n. 5, p. 319-326, 2011.

DONATTI, L. Foto do peixe antártico *Notothenia coriiceps* retirada no laboratório da EACF, 2009.

DONNIER-MARÉCHAL, M.; VIDAL, S. Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013-2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, n. just-accepted, 2016.

DORVAL, J.; HONTELA, A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 192, n. 2, p. 191-200, 2003.

DRINGEN, R.; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. **Brain Research**, v.623, p. 208-214, 1993.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649-671, 2000.

DURIEUX, E. D. H.; FARVER, T. B.; FITZGERALD, P. S.; EDER, K. J.; OSTRACH, D. J. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). **Fish Physiol Biochem**, v. 37, p.21–29, 2011

EASTMAN, J. T. Zoogeographic origins and evolution of the modern fauna. **Antarctic Fish Biology** – Evolution in a Unique Environment. San Diego, Academic Press, Inc.1993.

EASTMAN, J. T. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 2, p. 93-107, 2005.

EASTMAN, J. T.; McCUNE, A. R. Fishes on the Antarctic continental shelf: evolution of a marine species flock? **Journal of Fish Biology** 57 (Supplement A), 84–102, 2000.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** v.7, n.88, 1961

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish physiology and biochemistry**, 35(3), 519-539, 2009.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **The Journal of Experimental Biology** 217, 3301-3310, 2014.

ESPINOSA-DIEZ, C.; MIGUEL, V.; MENNERICH, D.; KIETZMANN, T.; SÁNCHEZ-PÉREZ, P.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox biology**, 6, 183-197, 2015.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H.; DIANZANI, M. U.; POLI, G.; SLATER, T. F. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. **Biochemical Journal**, 208(1), 129-140, 1982.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43, n.1, p.61-69, 1997.

FIELDS, L. G.; DEVRIES, A. L. Variation in blood serum antifreeze activity of Antarctic Trematomus fishes across habitat temperature and depth. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 185, p. 43-50, 2015.

GAGNON, M. M.; HOLDWAY, D. A. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 44, n. 1, p. 92-99, 1999.

GHOSH, A.; CHEUNG, Y. Y.; MANSFIELD, B. C.; CHOU, J. Y. Brain contains a functional glucose-6-phosphatase complex capable of endogenous glucose production. **Journal of Biological Chemistry**, 280(12), 11114-11119, 2005.

GIERA, M.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W. M. A. Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. **Chromatographia**, v. 75, n. 9-10, p. 433-440, 2012.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, v.55, p.400-408, 1953

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1100, n. 3, p. 217-234, 1992.

GONZÁLEZ-ALVAREZ, R.; ORTEGA-CUELLAR, D.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MORENO-ARRIOLA, E.; VILLASEÑOR-MENDOZA, K.; GÁLVEZ-MARISCAL, A.; VELÁZQUEZ-ARELLANO, A. The hexokinase gene

family in the zebrafish: structure, expression, functional and phylogenetic analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 152(2), 189-195, 2009.

GONZALEZ-CABRERA, P.J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V.K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in Antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺/K⁺-ATPase activities. **The Journal of Experimental Biology**, v.198, p.2279-2291, 1995.

GRIFFITHS, H. J. Antarctic Marine Biodiversity – What Do We Know About the Distribution of Life in the Southern Ocean? **Plos one**, 2010.

GRIFFITHS, H. J.; BARNES, D. K. A.; LINSE, K. Towards a generalized biogeography of the Southern Ocean benthos. **J Biogeogr** 36: 162–177, 2009.

GRIM, J. M.; MILES, D. R. B.; CROCKETT, E. L. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 3, p. 445-452, 2010.

GRIM, J. M.; SIMONIK, E. A.; SEMONES, M. C.; KUHN, D. E.; CROCKETT, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 164(2), 383-390, 2013.

HARRISON, K.; HALLETT, J.; BURCHAM, T. S.; FEENEY, R. E.; KERR, W. L.; YEH, Y. Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 241-243, 1987.

HAZEL, J. The effect of thermal acclimation upon brain acetylcholinesterase activity of *Carassius auratus* and *Fundulus heteroclitus*. **Life sciences**, v. 8, n. 14, p. 775-784, 1969.

DE LAS HERAS, V.; MARTOS-SITCHA, J. A.; YÚFERA, M.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles. **Aquaculture**, 448, 29-37, 2015.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. **Functional metabolism: Regulation and adaptation**, v. 1, p. 319-66, 2004.

HOGAN, J. W. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 347-353, 1970.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IMCOAST, 2015. Disponível em: <<http://www.imcoast.org/study-area/>>, Acesso em: 26/10/2015.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biol.** v.36, p.1047-1057, 2013.

KÄKELÄ, R. ; MATTILA, M.; HERMANSSON, M.; HAIMI, P.; UPHOFF, A.; PAAJANEN, V.; SOMERHARJU, P.; VORNANEN, M. Seasonal acclimatization of brain lipidome in a eurythermal fish (*Carassius carassius*) is mainly determined by temperature. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** , 294 (5) R1716-R1728, May 2008.

KAMLER, E.; KRASICKA, B.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Comparison of lipid content and fatty acid composition in muscle and liver of two notothenioid fishes from Admiralty Bay (Antarctica): an eco-physiological perspective. **Polar Biology**, v. 24, p. 735-743. 2001.

KAWALL, H. G.; TORRES, J. J.; SIDELL, B. D.; SOMERO, G. N. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, v.140, p.279-286, 2002.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6183-6188. 1976.

KNOX, G. A. The biology of the Southern Ocean. **Cambridge University Press**, p.444, 1994.

KOZLOVSKAYA, V. I.; MAYER, F. L.; MENZIKOVA, O. V.; CHUYKO, G. M. Cholinesterases of aquatic animals. **Reviews of environmental contamination and toxicology** (pp. 117-142). Springer New York, 1993.

KREBSBACH, P. **Respostas bioquímicas e fisiológicas ao metabolismo renal de dois teleósteos antárticos, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844), submetidos ao estresse térmico.** 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2014.

KUZU, M.; ASLAN, A.; AHMED, I.; COMAKLI, V.; DEMIRDAG, R.; UZUN, N. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes from the gill tissue of Lake Van fish and analyzing the effects of some chalcone derivatives on enzyme activities. **Fish physiology and biochemistry**, 1-9, 2015.

LA MESA, M.; EASTMAN, J. T.; VACCHI, M. The role of notothenioid fish in the food web of the Ross Sea shelf waters: a review. **Polar Biol**, v. 27, p. 321–338. 2004.

LAUGHLIN S. B.; STEVENINCK, R. R. DE R. V.; ANDERSON, J. C. The metabolic cost of neural information. **Neuroscience**, v.1, n.1, 1998.

LEGGATT, R. A.; BRAUNER, C. J.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, G. K. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 146(3), 317-326, 2007.

LEIBEL, W. S. An analysis of esterase activities from surgeonfish tissues yields evidence of an atypical pseudocholinesterase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 437-447, 1988.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G. & MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameter of *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.239, p. 497-507, 2004.

LI, M.; GAO, Z.; WANG, Y.; WANG, H.; ZHANG, S. Identification, expression and bioactivity of hexokinase in amphioxus: Insights into evolution of vertebrate hexokinase genes. **Gene**, 535(2), 318-326, 2014.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **J. Fish Biol.** v.67, p.752-766, 2005.

LOWRY, O. H.; PASSONNEAU, J. V. Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 10, p. 2268-2279, 1966.

L'UBOMÍRA T.; KAMODYOVÁ, N; ČERVENKA, T.; CELEC, P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 5, 2015.

LUSHCHAK, L. P.; BAHNJUKOVA, T. V.; STOREY, K. B. Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31, 1059–1067. 1998.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.30–35, 2006a.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues: 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.** v.143, p.36-41, 2006b.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. D. S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S'A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.** v.172–173, p.21–28, 2014.

MARICONDI-MASSARI, M.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 23,n. 5, p. 283– 290, 1998.

MARTINEZ, E. "**Biochemical Aspects of the Thermal Sensitivity and Energy Balance of Polar, Tropical and Subtropical Teleosts**". Graduate School Theses and Dissertations, College of Marine Science. University of South Florida. 2013.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries.** v.15, p.75-88, 2005.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**,41(1), 31-91, 1993.

MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, p. 3167-3173, 2003.

MITHIEUX, G. New knowledge regarding glucose-6 phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. **European Journal of Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 137-145, 1997.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MOON, T. W.; MOMMSEN, T. P. Enzymes of intermediary metabolism in tissues of the little skate, *Raja erinacea*. **J. Exp. Zool.** 244, 9–15, 1987.

MORROW, J. E.; MAURO, A. Body temperatures of some marine fishes. **Copeia**, v. 1950, n. 2, p. 108-116, 1950.

MRUK, D. D.; SILVESTRINI, B.; MO, M. Y.; CHENG, C. Y. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, 65(4), 305-311, 2002.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3655-3664, 2012

MUELLER, I. A.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. **The Journal of Experimental Biology**, v.214, p.3732-3741, 2011.

MUSRATI, R. A.; KOLLAROVA, M.; MERNIK, N.; MIKULASOVA, D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. **General physiology and biophysics**, 17, 193-210, 1998.

NEAR, T. J.; PESAVENTO, J. J.; CHENG, C. C. Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 32, 881–891, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 5ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2011.

NIEMIERKO, S; SKANGIEL-KRAMSKA, J.; MLECZKO, M.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The effect of the assay temperature on brain acetylcholinesterase activity of two Antarctic fish species. **Bulletin de L'Academie Polanaise Des Sciences**, 15(12), 821-826, 1978.

NORDBERG, G. F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. **Toxicology letters**, v. 192, n. 1, p. 45-49, 2010.

O'GRADY, S. M.; DE VRIES, A. L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.57, p.219-228, 1982.

PANSERAT, S.; MÉDALE, F.; BREQUE, J.; PLAGNES-JUAN, E.; KAUSHIK, S. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of nutritional biochemistry**, 11(1), 22-29, 2000.

PECK, L. DeVries: the Art of not freezing fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 14, p. 2146-2147, 2015

PEDREIRO, M. Foto do peixe antártico *Notothenia rossii* retirada no laboratório da EACF, 2011.

PEDREIRO, M. R. D. **Estudo comparativo do efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos dos peixes antárticos *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia***

corriceps (Richardson, 1844). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2014.

PETZEL, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biol** v.28, p.763–768, 2005

PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquatic toxicology**, v. 70, n. 3, p. 169-178, 2004.

PFUHL, H. A.; MCCAVE, I. N. Evidence for late Oligocene establishment of the **Antarctic Circumpolar Current**. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 235, p. 715– 728, 2005.

PHILLIPS, T. A.; SUMMERFELT, R. C.; ATCHISON, G. J. Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in walleye (*Stizostedion vitreum*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 43, n. 1, p. 75-80, 2002.

POHANKA, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008–present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 22, n. 8, p. 871-886, 2012.

POLI, G.; DIANZANI, M. U.; CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T.; LANG, J.; ESTERBAUER, H. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. **Biochemical Journal**, 227(2), 629-638, 1985.

PÖRTNER, H. O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95-97, 2007.

PÖRTNER, H.O., MARK, F.C., BOCK, C., Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v.141, p.243-260, 2004.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.

QUINTANEIRO, C.; QUERIDO, D.; MONTEIRO, M.; GUILHERMINO, L.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M. Transport and acclimation conditions for the use of an estuarine fish (*Pomatoschistus microps*) in ecotoxicity bioassays: effects on enzymatic biomarkers. **Chemosphere**, 71(10), 1803-1808, 2008.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothernia rossii* and *Notothernia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, 98(3), 775-788, 2015.

RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the

Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish physiology and biochemistry**, 41(5), 1205-1220, 2015.

ROVER JR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, 24(1), 112-119, 2001.

RUSSELL, R. J.; GERIKE, U.; DANSON, M. J.; HOUGH, D. W.; TAYLOR, G. L. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. **Structure**, 6(3), 351-361, 1998.

RYAN, S.N. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Experientia**. v.51, p. 768-774, 1995.

SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557-565, 2002.

SANDERSFELD, T.; DAVISON, W.; LAMARE, M. D.; KNUST, R.; RICHTER, C. Elevated temperature causes metabolic trade-offs at the whole-organism level in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **The Journal of experimental biology**, 218(15), 2373-2381, 2015.

SASTRY, K. V.; SHARMA, K. Effects of mercuric chloride on the activities of brain enzymes in a fresh water teleost, *Ophiocephalus* (*Channa*) *punctatus*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 9, n. 4, p. 425-430, 1980.

SATTIN, G.; BAKIU, R.; TOLOMEO, A. M.; CARRARO, A.; COPPOLA, D.; FERRO, D.; SANTOVITO, G. Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Hydrobiologia**, 761(1), 363-372, 2015.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands**, v.68, n.4, p.369-392, 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Anal Biochem**; v.25, p.192-205, 1968

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C.J.; FRANKLIN, C.E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v.1, p.151-154, 2005.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian

members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, 360(1), 1-16, 2001.

SHIN, S. C.; KIM, S. J.; LEE, J. K.; AHN, D. H.; KIM, M. G.; LEE, H.; LEE, J.; KIM, B.; PARK, H. Transcriptomics and Comparative Analysis of Three Antarctic Notothenioid Fishes. **Plos One** 7(8): e43762, 2012.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p.291-295, 1997

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung Von Gewässerverschmutzungen**. Berlim, Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Universidade Técnica de Berlim, 1998.

SKORA, K. E.; NEYELOV, A. V. Fish of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). **Polar Biology**, v. 12, n. 3-4, p. 469- 476., 1992.

SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDES, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology**.v.131, p. 271–296, 2002.

SOMERO G. N; DEVRIES A. L. Temperature tolerance of some Antarctic fishes. **Science**. v.156, p.257–258, 1967.

STOREY, K. B. Comparative enzymology—new insights from studies of an “old” enzyme, lactate dehydrogenase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2015.

STROBEL, A.; BURKHARDT-HOLM, P.; SCHMID, P.; SEGNER, H. Benzo (a) pyrene Metabolism and EROD and GST Biotransformation Activity in the Liver of Red-and White-Blooded Antarctic Fish. **Environmental science & technology**, 49(13), 8022-8032, 2015.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H.O.; MARK, F.C. Elevated temperature and PCO₂ shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v.166, p.48-57, 2013.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19(6), 1607-1615, 2000.

SULLIVAN, K. M.; SOMERO, G. N. Enzyme activities of fish skeletal muscle and brain as influenced by depth of occurrence and habits of feeding and locomotion. **Marine Biology**, v. 60, n. 2-3, p. 91-99, 1980.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TKACHENKO, H.; KURHALUK, N.; GRUDNIEWSKA, J.; ANDRIICHUK, A. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. **Fish physiology and biochemistry**, 40(4), 1289-1300, 2014.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369-7375, 2003.

TRUTE, M.; GALLIS, B.; DONEANU, C.; SHAFFER, S.; GOODLETT, D.; GALLAGHER, E. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic toxicology**, 81(2), 126-136, 2007.

TSENG, Y. C.; CHEN, R. D.; LUCASSEN, M.; SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R.; ABELE, R. e HWANG, P. P. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish. **Plos One**, v.6, n.3, 18180, 2011.

TSENG, Y. C.; LIU, S. T.; HU, M. Y.; CHEN, R. D.; LEE, J. R.; HWANG, P. P. Brain functioning under acute hypothermic stress supported by dynamic monocarboxylate utilization and transport in ectothermic fish. **Frontiers in Zoology**, 11(1), 1, 2014.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (zoarcidae). **The Journal of Experimental Biology** v.202, p.3611–3621, 1999.

VERMA, A. K.; PAL, A. K.; MANUSH, S. M.; DAS, T.; DALVI, R. S.; CHANDRACHODAN, P. P.; APTE, S. K. Persistent sub-lethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. **Pesticide biochemistry and physiology**, 87(3), 229-237, 2007.

VORNANEN, M.; PAAJANEN, V. Seasonal changes in glycogen content and Na⁺K⁺-ATPase activity in the brain of crucian carp. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.291, p.482–489, 2006.

WANG, Y.; CHEN, C.; ZHAO, X.; WANG, Q.; QIAN, Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus*

carpio) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide biochemistry and physiology**, 122, 81-85, 2015.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v.77, p.325-333, 1981.

WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 12, p. 2049-2057, 2003.

WINDISCH, S. H.; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H, O.; FRICKENHAUS, S., LUCASSEN, M., Thermal acclimation in Antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.301, R1453-R1466, 2011.

WU, S. M.; LIU, J. H.; SHU, L. H.; CHEN, C. H. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 187, 202-213, 2015.

YAMASHITA, M.; YABU, T. & OJIMA, N. Stress protein Hsp70 in fish. **Aqua-BioScience Monographs**. v.3, n. 4, p.111-141, 2010

<<http://www.ierfh.org/br.txt/Nootropicos2009.html> > Acessado em 12/04/2016

ANEXO 1

PROTOCOLO DAS ANÁLISES DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para as enzimas (metabolismo de carboidratos), segue o protocolo:

- 1) Pesar aproximadamente 100 mg de amostra, sempre anotar o peso precisamente.
- 2) Adicionar tampão Tris-HCl pH 7,4 50 mM em volume correspondente a 5x o peso do tecido e homogeneizar bem.
- 3) Sonicar por 30s em ciclos de 2/8 s (ou 20 J). Manter em banho de gelo, pois o processo de sonicação gera calor.
- 4) Centrifugar por 10 min a 12000 rpm, 4°C. Retirar sobrenadante.
 - Importante realizar todo o processo em banho de gelo.

As enzimas estão presentes em diferentes concentrações nos tecidos. No sistema de reação, o substrato da enzima encontra-se saturado, de forma que a enzima possa exibir sua atividade máxima. No entanto, a enzima deve estar presente também em uma concentração adequada para que consuma numa taxa constante, permitindo quantificar sua atividade.

Caso necessite: a amostra deve ser diluída em tampão Tris-HCl pH 7,4 50mM, e as diluições devem ser mantidas em banho de gelo.

PROTOCOLO DAS ANÁLISES DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E NÃO ENZIMÁTICAS

Para o estresse oxidativo, segue o protocolo:

- 1) Pesar aproximadamente 100 mg de amostra, sempre anotar o peso precisamente.
- 2) Adicionar tampão Tris-HCl pH 7,4 50 mM em volume correspondente a 5x o peso do tecido e homogeneizar bem (2 ml).
- 3) Centrifugar por 10 min a 12000 rpm, 4°C. Retirar sobrenadante.
 - Importante realizar todo o processo em banho de gelo.

As enzimas estão presentes em diferentes concentrações nos tecidos. No sistema de reação, o substrato da enzima encontra-se saturado, de forma que a enzima possa exibir sua atividade máxima. No entanto, a enzima deve estar presente também em uma concentração adequada para que consuma numa taxa constante, permitindo quantificar sua atividade.

Caso necessite: a amostra deve ser diluída em tampão Tris-HCl pH 7,4 50 mM, e as diluições devem ser mantidas em banho de gelo.

PROTOCOLO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD, 1976)

Princípio do método: O método baseia-se na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm.

Quantificação da concentração de proteínas (3 replicatas por amostra)

Em microplaca de 96 poços:

- Pipetar 10 µl do branco em triplicata (solução de homogeneização das amostras)
- Pipetar 10 µl da curva-padrão em triplicata (0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg albumina de soro bovina (BSA)/ml (preparado em PBS 7,2)
- Pipetar 10 µl das amostras (manter no gelo) em triplicata
- Pipetar em TODOS os poços utilizados 250 µl do reativo de Bradford
- Aguardar 5 min (manter a microplaca protegida da luz - estável até no máximo 1 h)
- Medir a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas
- Verificar TODOS os valores de absorbância para averiguar se alguma das amostras precisa ser diluída novamente (caso seu valor de ABS esteja acima do valor do ponto correspondente a 1,0 mg BSA/ml), ou se a curva-padrão precisa ser refeita (caso o $r^2 < 0,95$).
- Calcular a concentração de proteínas

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA MALATO DESIDROGENASE (MDH – CHILDRESS E SOMERO, 1979)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 10 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação para 100 poços

| MALATO DESIDROGENASE | | | |
|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------|
| Sistema de Reação | Conc. cubeta | Conc. estoque | SR 875µ |
| Tampão Tris-HCl pH 7,4 | 50 mM | 200 mM | 2050 µL |
| Oxaloacetato | 0,4 mM | 8 mM | 50 µL |
| MgCl ₂ | 20 mM | 100 mM | 200 µL |
| NADH | 150µM | 14,1 mM | 11 µL |
| H ₂ O desionizada | | | 364 µL |

1. Pesar 10 mg de oxaloacetato (MM: 132,07 g.mol⁻¹), diluir em 9,328 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 172 µl de NaOH 1M, para pH 7,4.
2. Pesar 0,2033 g de MgCl₂ (MM: 203,3 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de NADH (MM: 709,4 g.mol⁻¹), diluir em 1 ml de água desionizada.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH – THUESEN *et al.*, 2005)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 10 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação para 100 poços

| LACTATO DESIDROGENASE | | | |
|------------------------------|--------------|---------------|---------|
| Sistema de Reação | Conc. cubeta | Conc. estoque | SR 875µ |
| Tampão Tris- HCl Ph 7,4 | 50 mM | 200 mM | 250 µL |
| Piruvato de sódio | 1,0mM | 10 mM | 100 µL |
| KCl | 100 mM | 2 M | 50 µL |
| NADH | 0,25 mM | 14,1 mM | 18 µL |
| H ₂ O desionizada | | | 475 µL |

1. Pesar 0,0055 g de piruvato de sódio (MM: 110,04 g.mol⁻¹), diluir em 5 ml de água desionizada.
2. Pesar 1,4912 g de KCl (MM: 74,56 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de NADH (MM: 709,4 g.mol⁻¹), diluir em 1 ml de água desionizada.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA CITRATO SINTASE (CS – SABOROWSKI E BUCHHOLZ, 2002)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 5 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 5 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal, aguardar por 5 min;
5. Adicionar 5 µl da solução de oxaloacetato para iniciar a reação;
6. Medir imediatamente a absorbância a 412 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação para 100 poços

| CITRATO SINTASE | | | |
|--|--------------|---------------|---------|
| Sistema de Reação | Conc. cubeta | Conc. estoque | SR 875µ |
| Solução 1 | | | |
| Tampão Tris-HCl pH 7,4 | 50 mM | 200 mM | 250 µL |
| KCl | 100 mM | 2 M | 50 µL |
| EDTA | 1,0 mM | 10 mM | 100 µL |
| DTNB | 200 µL | 3 mM | 67 µL |
| Acetil-SCoA (H ₂ O desionizada) | 200 µL | 6 mM | 33 µL |
| H ₂ O desionizada | | | 375 µL |
| Solução 2 | | | |
| Oxaloacetato (Start) | 500 µL | 8 mM | 5 µL |

Para a solução 1:

1. Pesar 1,4912 g de KCl (MM: 74,56 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
2. Diluir 5 ml de EDTA 20 mM em 5 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de DTNB (MM: 396,3 g. mol⁻¹), diluir em 8,46 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 60 µl de NaOH 1M.

Para a solução 2:

4. Pesar 10 mg de oxaloacetato (MM: 132,07 g.mol⁻¹), diluir em 9,328 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 172 µl de NaOH 1M, para pH 7,4.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATASE (G6Pase – FATHI *et al.*, 2002)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 96 poços, pipetar 20 µl do sobrenadante da amostra em quadruplicata;
3. Pipetar 20 µl do sistema de reação em duplicata para cada amostra;
4. Pipetar 20 µl de H₂O_{mq} em duplicata para cada amostra;
5. Pipetar em triplicata 40 µl de tampão imidazol (branco);
6. Fazer a curva padrão de fosfato inorgânico (40 µl por poço);
7. Incubar por 60 min, 20°C, 750 rpm (no *thermo shaker* para microplacas);
8. Parar a reação com 200 µL da solução 2 - RVO Mgu (10 mL RVO MG + 100 µL Tween 20 1% v/v);
9. Incubar por 15 min, 20°C, 250 rpm (no *thermo shaker* para microplacas);
10. Medir a absorbância a 600 nm.

Sistema de reação para 96 poços

| Sistema de reação | Conc. cubeta | Conc. estoque | SR |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|-----------|
| Solução 1 | | | |
| Tampão lidazol pH 7,4 | 100 mM | 400 mM | 500 µL |
| EDTA | 1,8 mM | 20 mM | 180 µL |
| Glicose-6-fosfato | 26,5 mM | 500 mM | 106 µL |
| NaOH | 1M | 1 M | 70 µL |
| H ₂ O _d | | | 144 µL |
| Solução 2 | | | |
| RVO MG | | | 10 mL |
| Tween 20 | | | 100 µL |

Para solução 1:

1. Diluir 0,1213 g de EDTA (MM: 404,45 g.mol⁻¹) em 15ml de água desionizada.
2. Diluir 2 g de NaOH (MM: 40g.mol⁻¹) em 50 ml de água desionizada.

Para solução 2:

3. Solução 2A: Molibdato de amônia 4,2%
Pesar 4,2 g de molibdato de amônia e dissolver em 100 ml de ácido clorídrico 4 M.
 4. Solução 2B: Verde de Malachita 0,045%
Pesar 135 mg de verde de malachita e dissolver em água desionizada para volume final de 300 ml.
 5. Solução 2C: Tween 20 diluído 1:100
Pipetar 100 µl de Tween 20 + 9,9 ml de água desionizada.
 6. Solução de Rvo MG: Misturar 300 ml da solução B com 100 ml da solução A.
- Agitar por 30 minutos e filtrar. Estável por 6 meses.

**PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLICOGÊNIO
FOSFORILASE (GP) - CHANG, J. C., *et al*, 2007**

1. Sem normalizar;
2. Preparar o sistema de reação.

| REAGENTES | [POÇOS] | [USO] | VOL. ESTOQUE | SR 1ml |
|---------------------------|-----------|-----------------|--------------|-------------|
| Tampão K_2HPO_4 pH 7 | 45 mM | 200 mM | 50 mL | 225 μ L |
| NADP+ | 0,34 mM | 4 mM | 0,5mL | 85 μ L |
| G-1,6-P2 | 4 μ M | 0,4 mM | 1 mL | 10 μ L |
| EDTA-2K | 0,1 mM | 10 mM | 50mL | 10 μ L |
| MgCl ₂ | 15 mM | 100 mM | 50mL | 150 μ L |
| Fosfoglicomutase | 1,6 U/mL | 1.592,5 U/mL | 314 μ l | 1 μ L |
| G6PDH | 12 U/mL | 2.873,5 U/mL | 348 μ l | 4,2 μ L |
| 5'-AMP | 1,6 mM | 20 mM | 1 mL | 80 μ L |
| H ₂ O q.s.p | | 2mg/mL | | 259 μ L |
| Glicogênio | 0,2 mg/mL | | 5mL | 5 μ L |

8. Pipetar, em triplicata, 10 μ L de tampão (Branco), 10 μ L da amostra normalizada mais 70 μ L do sistema de reação com a pipeta multicanal.
9. Incubar durante 10 minutos na leitora de microplacas.
10. Iniciar a reação adicionando 5 μ L da solução de glicogênio (menos branco).
9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 5 min, em intervalos de 30 segundos. Os valores de absorbância deverão aumentar com o tempo.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA HEXOQUINASE (HK – BALDWIN, 2007)

Procedimento

1. Sem normalizar;
2. Pipetar 10 µl de tampão Tampão Imidazol pH 7,4, em triplicata (branco);
3. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

| HEXOQUINASE | | | |
|--|---------------------|------------------|----------------------|
| Sistema de Reação | Conc. cubeta | Conc. uso | SR (12 poços) |
| Tampão Imidazol pH 7,4 | 50 mM | 200 mM | 250 µl |
| Glucose | 2,0 mM | 20 mM | 100 µl |
| ATP | 2 mM | 10 mM | 200 µl |
| Mg Cl ₂ | 10 mM | 100 mM | 100 µl |
| NADP ⁺ | 0,4 mM | 8 mM | 50 µl |
| DTT | 1,0 mM | 20 mM | 50 µl |
| KCl | 2,0 mM | 20 mM | 100 µl |
| G-6-PDH | 0,3 U | 60 U/ml | 5 µl |
| H ₂ O desionizada q.s.p. 875 µl | | | 20 µl |

1. Glucose
 -PM: 180,16g de glucose – 1000 mM
 3,6032g de Glucose – 20 mM – 1000 ml
 0,036032g em 10 ml de água desionizada.

2. NADP⁺ (instável – preparar na hora)
 PM: 743,41g de NADP⁺ - 1000 mM
 5,947g de NADP⁺ - 8 mM – 1000 ml
 0,00596g em 1 ml de água desionizada.

3. KCl
 PM: 74,6g – 1000mM
 1,492 – 20 mM – 1000 ml
 0,05968g em 40 ml de água desionizada.

4. ATP (instável)
 PM: 551,14g de ATP – 1000 mM
 5,51g de ATP – 10 mM – 1000 ml
 0,0110228g em 2 ml de água desionizada.

5. DTT (Dithiothreitol) – (fotosensível)
 -PM: 154,25 de DTT – 1000 mM
 3,085 de DTT – 20 mM – 1000 ml
 0,03085g em 10 ml água desionizada

6. G-6-PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)
 500 U – 140 µl 3571,43 U/mL
 X - 1000 µl
 3571,43 U/mL x V1 = 60 U/mL x 0,235
 V1 = 3,9 µl para diluir em 235 µl de (NH₄)₂ SO₄ 3,2 pH 7,9
 *estável por 3 semanas no freezer -20°C

7. Mg Cl₂
 PM= 95,3 – 1000mM
 0,953g - 10 mM – 1000ml
 0,03812g em 40 ml de água desionizada

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE FOSFOFRUTOQUINASE (PFK – BALDWIN, 2007)

Procedimento

1. Sem normalizar;
2. Pipetar 10 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
3. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
4. Pipetar 62 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
5. Pipetar 8 µl de F-6-P (Start);
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação para 100 poços

| FOSFOFRUTOQUINASE | | | | |
|------------------------------------|---------------------|------------------|----------------|--------------------------|
| Sistema de Reação | Conc. cubeta | Conc. uso | Estoque | SR (12 poços) |
| Tampão Tris-HCl pH 8,2 | 50 mM | 200 | 50 ml | 250 µl |
| Mg Cl ₂ | 10,0 mM | 100 | 50 ml | 100 µl |
| ATP | 1,0 mM | 10 | 2 ml | 100 µl |
| NADH | 0,15 mM | 14,1 | 1 ml | 11 µl |
| AMP | 2,0 mM | 20 | 1ml | 100 µl |
| KCl | 250 mM | 2 | 50 ml | 125 µl |
| Glycerophosphate dehydrogenase | 1 U/ml | 200 U/ml | 89 ml | 5 µl |
| Aldolase | 1,2/ml | 413,22 U/ml | 2,43 ml | 3 µl |
| Triose phosphate isomerase | 10 U/ml | 2015 U/ml | 82 µl | 5 µl |
| H ₂ O desionizada 775µl | | | | 75 |
| Fructose-6-phosphate | 5,0 mM | 50 mM | 1 ml | 8 µl |

Reagentes

1. Triose Fosfato Isomerase (TPI)

- Uso: Pipetar 5 µl da TPI (11900 U) + 77 µl de (NH₄)₂ SO₄ 3,2 M pH= 6,0.
- Estoque: V= 380 µl; 5,2 mg proteína/ml; 11900 U

2. Glicerofosfato Desidrogenase (α-GDH)

- Uso: Pipetar 5 µl de α-GDH (1KU) + 84 µl de (NH₄)₂ SO₄ 32 M pH=6,0
- Estoque: V= 280 ml; 14,1 mg

3. Aldolase (Ald)

- Uso: Pipetar 3 µl de (Ald) no sistema de reação (1 ml).
- Estoque: v=2,42ml; 1000 U; 23 mg proteína/ml.

**PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE (G6PDH - GLOCK E MCLEAN,
1953 COM MODIFICAÇÕES)**

PROCEDIMENTO

- 1 – Sem normalizar;
- 2 - Pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 384 poços
- 3 - Pipetar 10 µl de tampão (branco, em triplicata) em microplaca de 384 poços.
- 4 – Pipetar 70 µl de meio de reação (com micropipeta multicanal)
- 5 - Medir o acréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 6 min, intervalos = 40 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão aumentar com o tempo). $\epsilon \text{ NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

| Meio de reação | Conc. Cubeta | Uso | SR 875 µ |
|-------------------------|--------------|--------|----------|
| NADP+ | 0,2 mM | 8 mM | 25 µl |
| D-glicose 6-fosfato | 1 mM | 100 mM | 10 µl |
| Tampão Tris-HCl, pH 7,4 | 100 mM | 200 mM | 500 µl |
| Água 875 µl | | | 340 µl |

Reagentes:

1. Glicose-6-Fosfato

- Estoque: $v = 109 \text{ ml}$; 257 mg/ml ; $\text{PM}: 260,1$

-Uso: Glicose-6-P 100 mM: 50,6 de G-6-P 988 mM + 449,4 µl de água

2- NADP+

-8mM

0,0059 g em 1 ml de água desionizada.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD -CROUCH *et al.*, 1981)

PROCEDIMENTO

- 1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras (manter gelo) para 1,0 mg/ml (Tris-HCl pH 7,4 50mM,)
- 2 – Separar 600 µl de amostra, acrescentar 200 µl de etanol e centrifugar a 12 000 g (0-4°C) durante 20 min
- 3 - Pipetar 30 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 4 - Pipetar 30 µl de etanol a 25% em TRIS (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 5 – Pipetar 70 µl de solução de NBT (Azul de nitrotetrazólio)
- 6 – Pipetar 100 µl de solução de hidroxilamina para iniciar a reação
- 7 – Medir a absorbância a 560 nm (tempo zero) e após 4 h de incubação (em microplacas tampadas e protegidas da luz, a temperatura ambiente)

Meio de reação (para 100 poços)

1. Solução de NBT (7,5 ml)

Preparar solução de EDTA 1,0 mM (10 ml) - dissolver 0,0037 g de EDTA sal dissódico ($MM = 372,24 \text{ g.mol}^{-1}$) em 10 ml de água desionizada.

Em outro recipiente, adicionar 375 µl da solução de EDTA a 1,0 mM em 7,125 ml de água desionizada e dissolver 0,0018 g de NBT ($MM = 817.64 \text{ g.mol}^{-1}$; [NBT] final na microplaca = 100 µM) nesta solução de EDTA ([final] = 0,05 mM).

2. Solução de hidroxilamina (12 ml)

Dissolver 0,0615 g de cloreto (ou sulfato) de hidroxilamina ($MM = 69.49 \text{ g.mol}^{-1}$) em 12 ml de tampão carbonato de sódio a 182 mM, pH 10,2 ([hidroxilamina] final na microplaca = 36,85 mM)

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT - BASEADO EM AEBI, 1984)

PROCEDIMENTO

1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras (gelo moído) para 1,0 mg/ml;

*** 1º Branco – tampão;

***2º Peróxido – tampão + peróxido (marcar µl)

*** Calcular a concentração de peróxido

2 – Pipetar 990 µl de meio de reação em cubeta de quartzo (em triplicata)

3 – Pipetar 10 µl da amostra

4 – Medir imediatamente a absorbância a 240 nm (tempo total = 60 s, intervalos = 1 s) em espectrofotômetro de cubeta (os valores de ABS deverão diminuir com o tempo). $\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 9,22$)

Meio de reação (50 ml)

2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 (pode ser estocado)

47,32 ml de água desionizada

70 µl de H_2O_2 (30%, $d=1,1 \text{ g.ml}^{-1}$, $\text{MM} = 34 \text{ g.mol}^{-1}$; concentração final no ensaio = 30 mM)

-Manter protegida da luz

Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 (50 ml)

Dissolver 7,88 g de Tris-HCl ($\text{MM} = 157,60 \text{ g.mol}^{-1}$) e 0,0931 g de EDTA sal dissódico ($\text{MM} = 372,24 \text{ g.mol}^{-1}$) em 40 ml de água desionizada. Acertar o pH para 8,0 e completar com água desionizada para o volume final de 50 ml.

Calcular a concentração de peróxido:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{\text{ABS H}_2\text{O}_2 - \text{ABS Branco}}{43,6} = 9,22$$

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE – GST (KEEN *et al.*, 1976 COM MODIFICAÇÕES)

PROCEDIMENTO

- 1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras (manter no gelo) para 1,0 mg/ml
- 2 – Pipetar 20 µl de tampão fosfato de potássio (branco) em microplaca de 96 poços (em triplicata)
- 3 – Pipetar 20 µl da amostra em microplaca de 96 poços (em triplicata)
- 4 - Pipetar 180 µl de meio de reação (com micropipeta multicanal)
- 5 – Medir imediatamente a absorbância a 340 nm (tempo total = 300 s, intervalos = 20-50 s; os valores de ABS deverão aumentar com o tempo)
 ϵ do tioéter (pH 6,5) = $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

***Meio de reação (para 100 poços = 20 ml)**

- 0,0093 g de GSH - Glutathione ([GSH] final = 1,5 mM)
- 0,0122 g de CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno ([CDNB] final = 2 mM; diluir inicialmente em 1 ml de etanol PA)
- 19 ml de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA DISSULFETO REDUTASE (GR) (SIES *et al.*, 1979)

PROCEDIMENTO

- 1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras (manter no gelo) para 4,0 mg/ml (diluír em PBS ou Tris-HCl) *** Teste sem normalizar (depende da quantidade de proteína da amostra).
 - 2 - Pipetar 50 μ l do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
 - 3 - Pipetar 50 μ l de PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
 - 4 – Pipetar 150 μ l de meio de reação (com micropipeta multicanal)
 - 5 - Medir o decréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 10 min, intervalos = 40 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão diminuir com o tempo).
- ϵ NADH = 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹

Meio de reação (16 ml / 100 poços) - Proteger da luz

- 0,0089 g de NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (MM = 833,4 g.mol⁻¹; [NADPH] final na microplaca = 0,5 mM)
- 0,0653 g de GSSG - Glutathiona dissulfeto (MM = 612,63 g.mol⁻¹; [GSSG] final na microplaca = 5,0 mM)
- 16 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5,0 mM, pH 7,6

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) - (WENDEL, 1981)

PROCEDIMENTO

- 1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras (manter em gelo) para 1,0 mg/ml.
- 2 - Pipetar 20 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 3 - Pipetar 20 µl de Fosfato de sódio (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 4 – Pipetar 140 µl de meio de reação 1 (com micropipeta multicanal) e aguardar 2 min
- 5 – Pipetar 40 µl de solução com peróxido de hidrogênio (com micropipeta multicanal)
- 6 - Medir o decréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 180 s, intervalos = 10-20 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão diminuir com o tempo).
(ϵ NADH = $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Meio de reação (para 100 poços)

Meio de reação 1 (14,5 ml) * - proteger da luz

- 0,0027 g de azida sódica ($\text{MM} = 65,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; [azida] final na microplaca = 2 mM)
- 0,0035 g de NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido ($\text{MM} = 833,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; [NADPH] final na microplaca = 0,2 mM)
- 0,0127 g de GSH – Glutathione reduzida ($\text{MM} = 307,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; [GSH] final na microplaca = 2 mM)
- 45 µl de glutathione redutase (GR, 2,7 mg prot.ml⁻¹, 168 U.mg prot⁻¹; [GR] final na microplaca = 1U.ml⁻¹)
- 14,45 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0)

Solução de peróxido de hidrogênio (10 ml– (5 mM) – manter protegido da luz– preparar no dia.

Preparar uma solução contendo 26 µl de H_2O_2 (~30%, $d=1,1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\text{MM} = 34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) em 10 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). Então, pipetar 1 ml desta solução + 9 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) ($[\text{H}_2\text{O}_2]$ final na microplaca = 0,5 mM)

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS - TBARS – FEDERICI *et al.* (2007)

- 1) Pegue suas amostras (tratar 60 µl de amostra com 120 µl TCA 10%, deixar em banho de gelo por 5 min; centrifugar por 5 min – 12000 rpm – 4°C)

- 2) Reagentes:
 - BHT em etanol 95% (Fazer na hora do uso) 0,0022g BHT-10mL etanol 95%
 - TBA 1,3% em NaOH 0,3% (Útil por 1 semana em T°C ambiente)
 - NaOH 0,3% 0,03g – 10mL água
 - TBA 1,3% 0,13g TBA – 10mL de NaOH 0,3%
 - PBS (pH = 7,4)
 - TCA 50% 50g TCA – 100 mL água

- 3) Prepare a curva de calibração (padrão):
 Solução estoque 60mM de MDA (Freezer –20°C)
 - * 10uL Sol.estoq. + 1990uL de água → Obtem-se uma solução 0,3mM de MDA

Em tubos de ensaio:

| [] final do padrão (uM) | Pipetar da solução de 0,3 mM MDA (uL) | Acrescentar água para volume final de 1 mL (uL) |
|--------------------------|---------------------------------------|---|
| 0,3 | 1 | 999 |
| 0,6 | 2 | 998 |
| 1,5 | 5 | 995 |
| 3 | 10 | 990 |
| 6 | 20 | 980 |
| 15 | 50 | 950 |
| 30 | 100 | 900 |

- 4) Pipetar em cada poço (em triplicata):
 - 40 uL do branco/padrão/amostra
 - 10 uL BHT
 - 140 uL PBS (pipeta multicanal)
 - 50 uL de TCA 50% (pipeta multicanal)
- 5) Pipete 75 uL de TBA 1,3% em NaOH 0,3% em todos os pocinhos (Use pipeta multicanal).
- 6) Coloque a placa em banho maria a **60°C por 1 hora.**
 - a. Cubra a base do agitador magnético com papel alumínio
 - b. Ligue a T°C do agitador no 350 rpm e aguarde chegar a 60°C
 - c. Espere esfriar e leia a 535 nm.

PROTOCOLO DE ANÁLISE DA ACETILCOLINESTERASE - (AChE - ELLMAN *et al.* 1961)

PROCEDIMENTO

- 1 – Após determinação da concentração de proteínas, normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml (diluir em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5)
- 2 - Pipetar 20 µl do tampão (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 3 - Pipetar 20 µl do sobrenadante da amostra (gelo moído) em triplicata em microplaca de 96 poços
- 4 – Pipetar 130 µl de solução de DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) com micropipeta multicanal
- 5 – Pipetar rapidamente 50 µl de iodeto de acetiltiocolina com micropipeta multicanal
- 6 - Medir o acréscimo na absorbância imediatamente a 405 nm (tempo total = 5-7 min, intervalos = 40-52 s) em espectrofotômetro de microplaca (os valores de ABS deverão aumentar com o tempo).

Soluções necessárias (para 100 poços)

*Solução de DTNB a 0,75 mM (14 ml)

- Adicionar 0,0042 g de DTNB ($\geq 98\%$, $MM = 396.35 \text{ g.mol}^{-1}$; [DTNB] final na microplaca = 0,4875 mM) em 500 µl de metanol. Após diluir, acrescentar 13,5 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Manter protegido da luz.

*Solução de iodeto de acetiltiocolina a 9 mM (6 ml)

- Diluir 0,0161 g de iodeto de acetiltiocolina ($\geq 98\%$, $MM = 289.18 \text{ g.mol}^{-1}$; [Acetiltiocolina] final na microplaca = 2,25 mM) em 6 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5.

Tampão fosfato de potássio a 0,1 M (500 ml)

1. Preparar solução de K_2HPO_4 a 0,1 M

-Dissolver 6,9672 g de K_2HPO_4 ($MM = 174,18 \text{ g.mol}^{-1}$) em 350 ml de água desionizada e acertar o volume para 400 ml

2. Preparar solução de KH_2PO_4 a 0,1 M

-Dissolver 5,4436 g de KH_2PO_4 ($MM = 136,09 \text{ g.mol}^{-1}$) em 350 ml de água desionizada e acertar o volume para 400 ml

3. Misturar ambas as soluções

Concentração de tióis não protéicos (glutathiona e outros tióis) - baseado em SEDLAK e LINDSAY, 1968)

Princípio do método: o método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

PROCEDIMENTO

1. – Adicionar 50 µl da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 50% aos 200 µl do sobrenadante ainda congelado do tecido ([proteínas] > 5 mg.ml⁻¹). Para o branco, pipetar 50 µl da solução de ácido tricloroacético a 50% em 200 µl de Tris
2. – Misturar bem
3. – Centrifugar a 5000 g por 10 min e 4 °C
4. – Pipetar 50 µl do branco em microplaca em triplicata
5. – Pipetar 50 µl da curva-padrão em microplaca em triplicata (preparada em separado)
6. – Pipetar 50 µl do sobrenadante das amostras em microplaca (96 poços) em triplicata
7. – Adicionar em todos os poços utilizados 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9
8. – Adicionar em todos os poços utilizados 20 µl de solução de DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico)
9. – Aguardar 5-10 min a temperatura ambiente
10. – Mediar a absorbância a 415 nm

Soluções necessárias (para 100 amostras + 2 brancos + curva-padrão)

1. Solução de ácido tricloroacético a 50% (10 ml)
Dissolver 5 g de ácido tricloroacético em 10 ml de água desionizada
2. Solução de DTNB (8 ml)
Dissolver 0,0079 g de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, mM=396,3 g.mol⁻¹) em 500 µl de metanol PA. Então, adicionar 7,5 ml de tampão Tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([DTNB] = 2,5 mM).
3. Curva-padrão de GSH (fazer uma curva para cada análise realizada)
Dissolver 0,0012 g GSH (mM = 307,32 g.mol⁻¹) em 976 µl de tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([GSH] = 4 mM). A partir desta solução, preparar as demais conforme a tabela a seguir.

| [GSH] desejada | Volume de tampão trisbase a 0,4 M, pH 8,9 | Volume das soluções de GSH | Volume final |
|----------------|---|----------------------------------|--------------|
| 160µM | 1440 µl | 60 µl da solução de GSH a 4 mM | 1500 µl |
| 80µM | 750 µl | 750 µl da solução de GSH a 160µM | 1500 µl |
| 40µM | 750 µl | 750 µl da solução de GSH a 80µM | 1500 µl |
| 20µM | 750 µl | 750 µl da solução de GSH a 40µM | 1500 µl |
| 10µM | 750 µl | 750 µl da solução de GSH a 20µM | 1500 µl |
| 5µM | 750 µl | 750 µl da solução de GSH a 10µM | 1500 µl |
| 0µM | 1500 µl | 0 µl | 1500 µl |